

REINOSO, E. B.
Análisis Epidemiológ



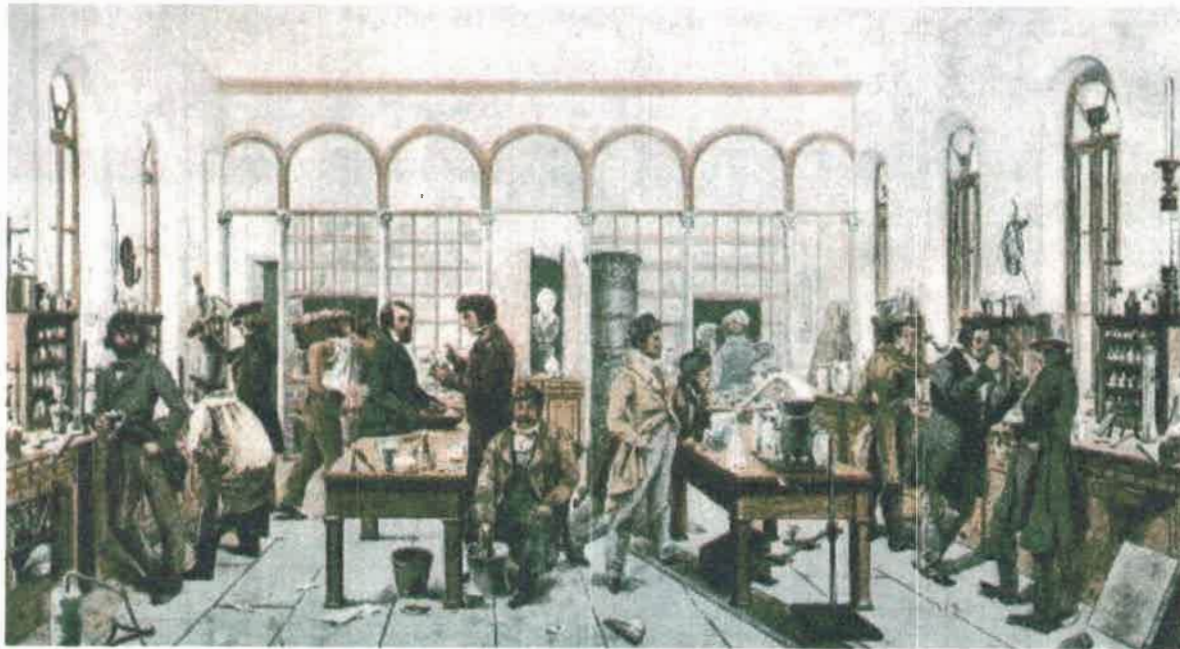
2004

60186

"Análisis epidemiológico y molecular de cepas de
Staphylococcus aureus de distintos orígenes"

Tesis Doctoral

Mic. Elina B. Reinoso



2004



02103

Handwritten text, likely a title or address, appearing as bleed-through from the reverse side of the page.

Handwritten text, possibly a name or title, appearing as bleed-through from the reverse side of the page.

Handwritten text, possibly a name or title, appearing as bleed-through from the reverse side of the page.



1001

El presente trabajo de Tesis Doctoral fue realizado en el laboratorio de Genética Microbiana del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales y se presenta como requerimiento para optar al título de Doctor en Ciencias Biológicas.

DIRECTOR: Dra. Cristina Bogni

Aprobada por la Comisión Especial, integrada por:

Dra. Sofía Chulze

Sofía Chulze

Dr. Carlos Argaraña

Carlos Argaraña

Dr. Edgardo Padula

P/A RUY A.T. de SO

25 de Agosto de 2004

60186

MFN:

Clasif:

T-357

Cuentan de un paisano de Catamarca que se encontró en el campo un huevo muy grande.

Nunca había visto nada igual. Y decidió llevarlo a su casa.

¿Será de avestruz?, preguntó su mujer.

No, es demasiado abultado; dijo el abuelo

¿Y si lo rompemos?, propuso el ahijado

Es una lástima. Perderíamos una hermosa curiosidad, respondió la abuela

Miren, en la duda, se lo voy a colocar a la pava que está calentando huevos

Tal vez con el tiempo nazca algo, afirmó el paisano y así lo hizo

Cuenta la historia que a los quince días nació un pavito oscuro, grande, nervioso

Que con mucha avidez comió todo el alimento que encontró a su alrededor.

Luego miró a la madre con vivacidad y le dijo entusiasta:

"Bueno, ahora vamos a volar"

La pava se sorprendió muchísimo de la proposición de su flamante crío, y le explicó: "Mirá, los pavos no vuelan. A vos te hace mal comer apurado".

Entonces todos trataron de que el pavito comiera más despacio, el mejor alimento y en la medida justa. Pero el pavito terminaba su almuerzo o su cena, su desayuno o merienda y le decía a sus hermanos "vamos muchachos, a volar!".

Todos los pavos le explicaban nuevamente: "Los pavos no vuelan. A vos te hace mal la comida".

El pavo fue hablando más de comer y menos de volar. Y creció y murió en la pavada general pero era un cóndor!

Había nacido para volar hasta los 7000 metros; pero como nadie volaba!

El riesgo de morir en la pavada general es muy grande. Como nadie vuela!

Muchas puertas están abiertas porque nadie las cierra y otras están cerradas porque nadie las abre.

El miedo al hondazo es terrible, pero la verdadera protección está en las alturas.

Especialmente cuando hay hambre de elevación y buenas alas.

Enrique Mariscal

10/11

12

13

14

15

16

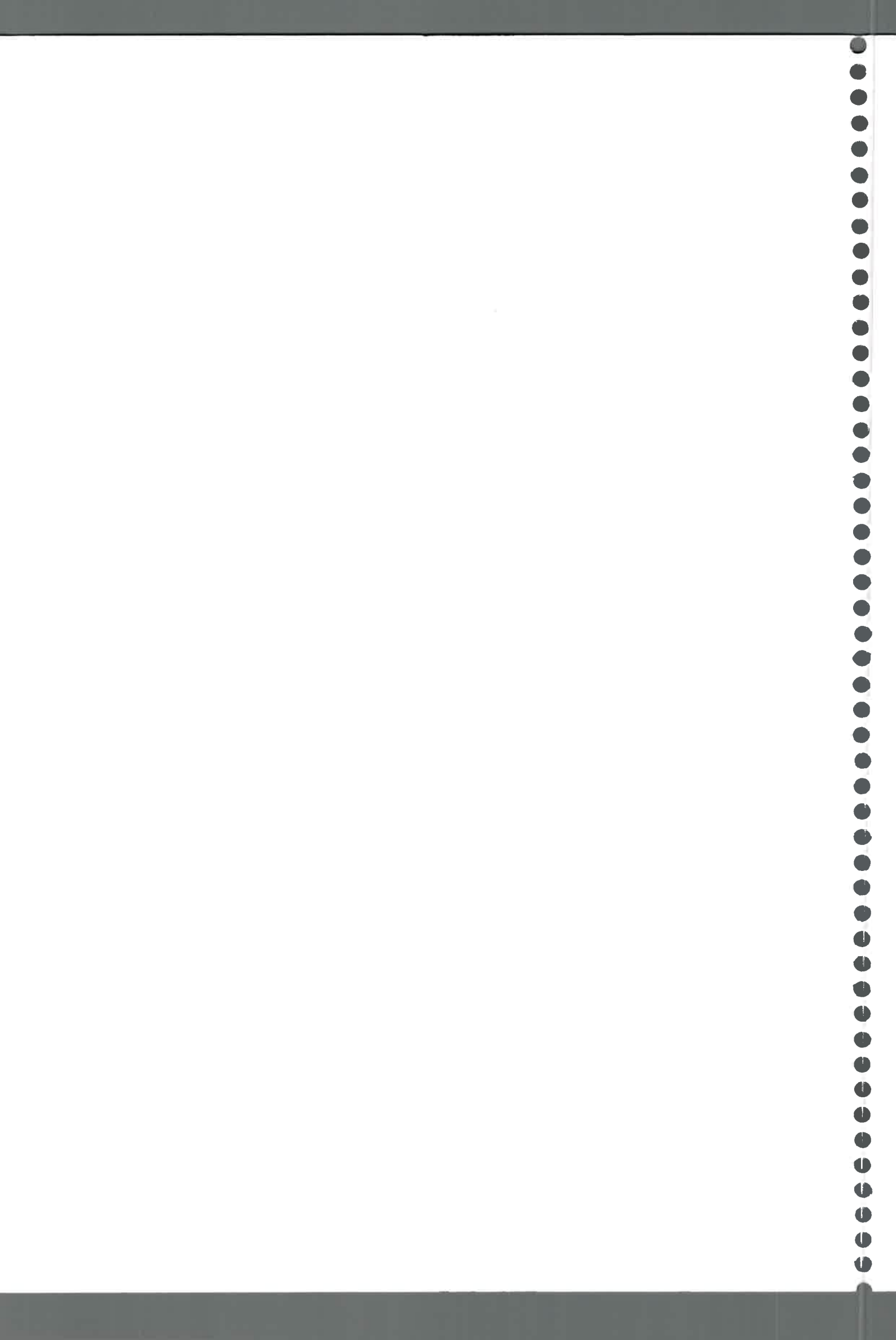
17

18

19

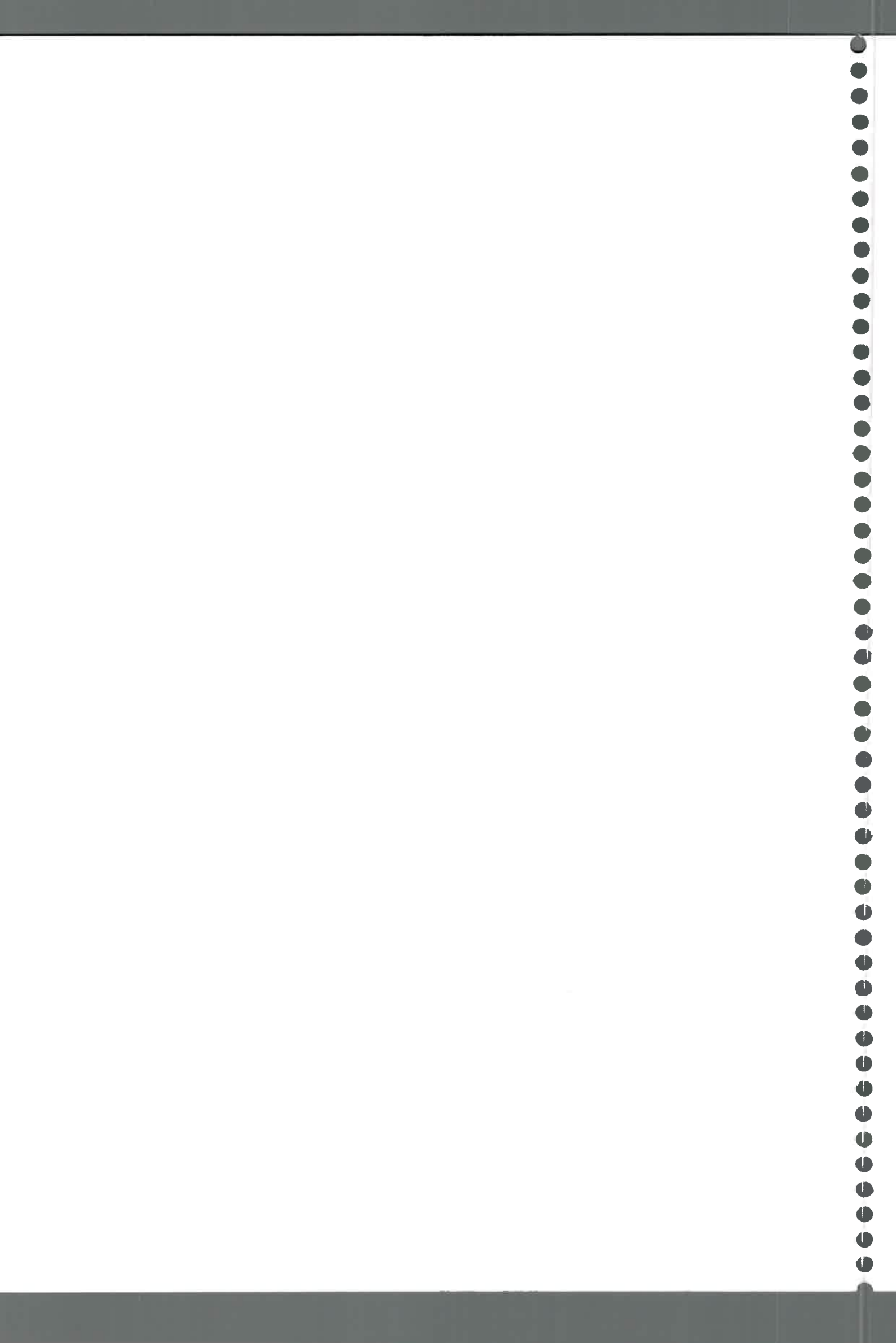
A mis Padres y Hermana

A Guillermo



AGRADECIMIENTOS

- A Dios, quien guía mi vida y me permite ser quien soy.
- A mis Padres por su amor incondicional y a mi Papá quien despertó en mí la curiosidad por el fascinante mundo científico.
- A mi tía Ofelia por estar siempre y porque la quiero mucho.
- A Guille, por todo su amor, por las palabras a tiempo y por darme apoyo y fuerza en todos mis proyectos.
- A mi Directora, Dra. Cristina Bogni, quien aceptó la Dirección de la Tesis y me ayudó para que pudiese ser finalizada.
- A mis compañeros del laboratorio, a Mirta, Ileana, Martín. A la Dra. Claudia Raspanti por todos estos años compartidos y por su buena onda de siempre. A la Dra. Liliana Odierno, por estar siempre dispuesta, por compartir mis largas horas de trabajo y porque le tengo un gran cariño.
- A los Miembros Jurados por haber aceptado y colaborado en la realización de la Tesis.
- A la Dra. Sofía Chulze porque admiro su profesionalismo y por brindarme su apoyo en la continuación de esta Tesis.
- A las Dras. Gladys Mori, Adriana Fabra y Estela Castro por brindarme la oportunidad de dar mis primeros pasos en la investigación. A la Dra. Gladys Mori, a quien le tengo un gran cariño, le agradezco inmensamente toda la ayuda brindada desde el día que entré a la Universidad.
- A la Dra. Ana Giraudo, por enseñarme la responsabilidad y disciplina necesaria para trabajar en investigación.
- Al Prof. Dr. Christoph Lämmler, quien me permitió formar parte de su grupo de investigación en la Universidad Justus-Liebig en Gießen (Alemania) y a los Dres. Jörg Alber y Amr el-sahed con quienes aprendí mucho y compartí gratos momentos de trabajo. Danke schön!
- A Fernando quien colaboró de manera excelente con algunos de mis experimentos.
- A los integrantes del Departamento de Microbiología e Inmunología por darme la posibilidad de utilizar y compartir las instalaciones.
- A todos mis amigos por su cariño y el apoyo que siempre necesito (Jenny, Marisa, Ana C., Ana D., Gaby, Gato, Dante, Silvina, Charly, Mechi, Mariángeles, Polo, Ariel).
- A la Universidad, a CONICET y a la Deutscher Akademischer Austauschdienst (DAAD) por permitir realizar mi formación profesional y académica.

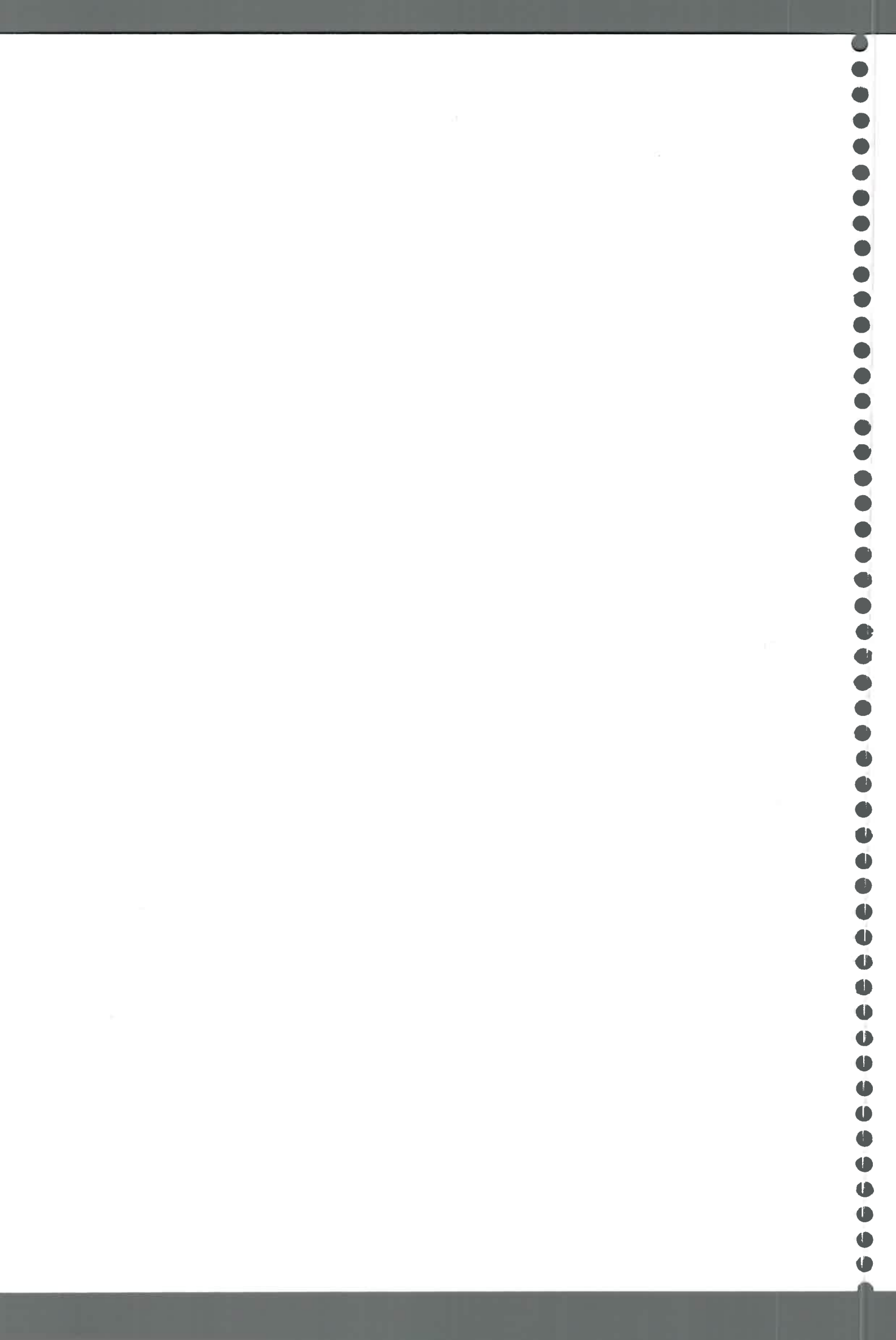


Introducción

<i>Staphylococcus aureus</i>	1
Resistencia a antibióticos	2
Factores de virulencia	4
Importancia de la tipificación	7
Métodos fenotípicos versus moleculares	8
Criterios de utilización de diferentes métodos de tipificación.....	12
Especificidad de huésped.....	13
Marcadores moleculares	14
La taxonomía numérica como teoría clasificatoria	15
Aplicación de las técnicas de la taxonomía numérica	16
Estructura taxonómica	17
OBJETIVO GENERAL	18

Materiales

Medios de cultivo	19
Reactivos y soluciones	19
Enzimas	20
Cepas	20
Cepas controles	27
Condiciones de cultivo	27
Conservación de las cepas	27
Liofilización de las cepas	27
Conservación del DNA	27
Cebadores	27
Abreviaciones.....	29

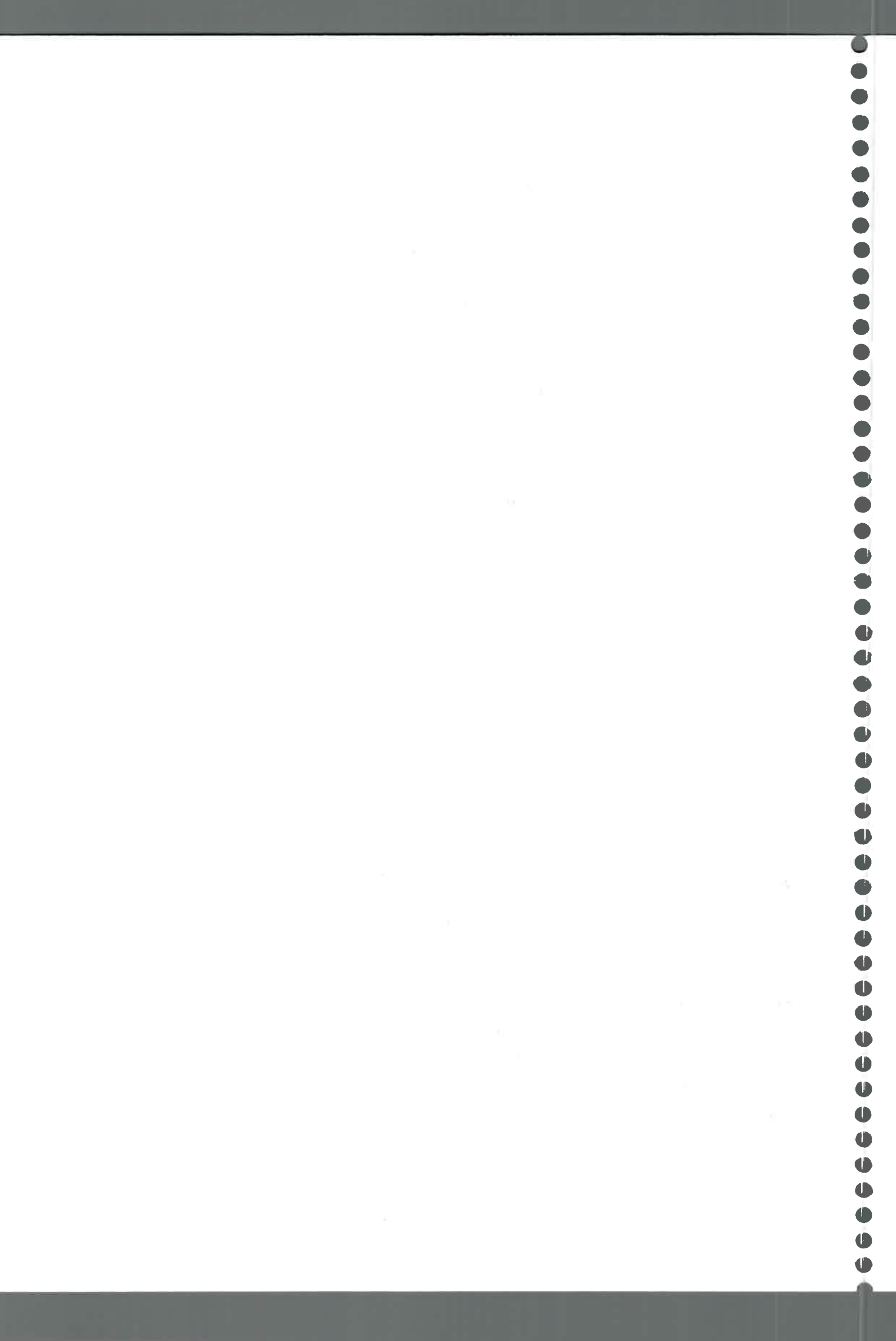


Métodos

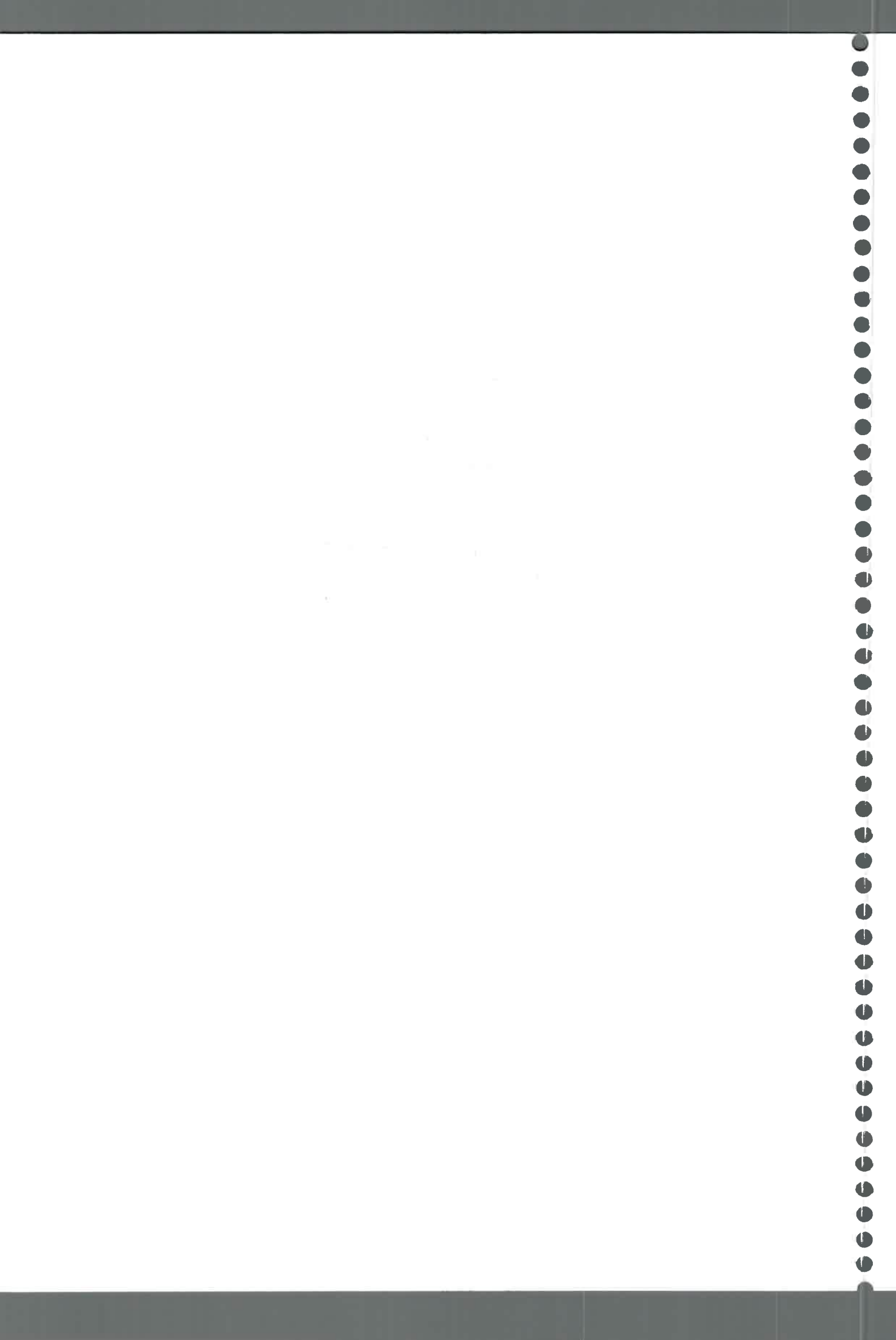
Aislamiento e identificación de cepas de <i>S. aureus</i>	30
Identificación mediante pruebas bioquímicas	30
Caracterización de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	31
Biotipificación	31
Determinación de la resistencia a antibióticos	34
Extracción de ADN de plásmidos de <i>S aureus</i>	34
Optimización de las técnicas de RAPD-PCR y REP-PCR	36
Mezclas de DNA por RAPD-PCR Y REP-PCR.....	38
Electroforesis de campos pulsantes (PFGE).....	38
Análisis de los productos de amplificación.....	39
Análisis estadístico.....	41
Análisis molecular de genes relacionados a la virulencia	42
Gen <i>spaA</i>	42
Gen <i>coa</i>	43
Gen <i>clfA</i>	43
Gen <i>cna</i>	44
Gen <i>cap5-cap8</i>	44
Gen <i>sea</i>	44
Gen <i>agr</i>	45
Gen <i>hld</i>	45
Gen <i>sae</i>	45
Determinación de hemolisinas	46
Determinación de coagulasa	47

Resultados

Aislamiento e identificación de cepas de <i>Staphylococcus aureus</i>	48
Caracterización de cepas de <i>S aureus</i> : técnicas convencionales.....	48
Determinación de la resistencia a antibióticos.....	52
Extracción de ADN de plásmidos de <i>S aureus</i>	59
Caracterización de cepas de <i>S aureus</i> : técnicas moleculares.....	60
Optimización de la técnica de RAPD-PCR.....	60
Optimización de la técnica de REP-PCR.....	65
Análisis de las cepas por RAPD-PCR.....	66

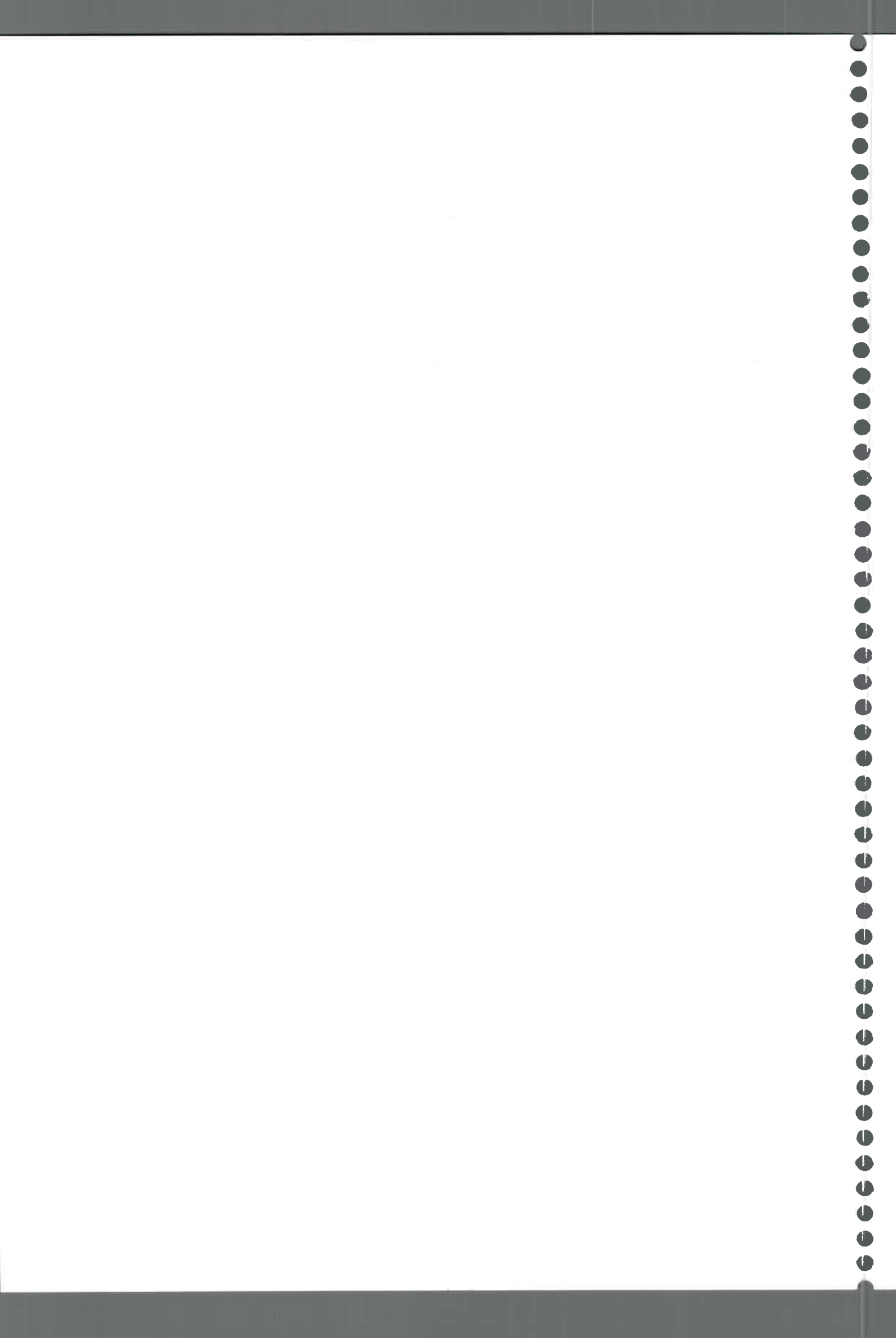


Análisis molecular de cepas de <i>S aureus</i> por RAPD-PCR.....	68
Cepas de <i>S aureus</i> aisladas de huéspedes humanos.....	69
Cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de bovinos.....	77
Cepas de <i>S aureus</i> aisladas de humanos y de bovinos.....	84
Cepas de <i>S aureus</i> aisladas de portadores sanos.....	90
Cepas de <i>S aureus</i> aisladas de alimentos.....	92
Cepas de <i>S aureus</i> aisladas de huéspedes humanos, bovinos y de alimentos.....	95
Análisis estadístico y taxonómico de cepas de <i>S aureus</i> por REP-PCR.....	97
Cepas de <i>S aureus</i> aisladas de humanos.....	97
Cepas de <i>S aureus</i> aisladas de bovinos.....	99
Cepas de <i>S aureus</i> aisladas de humanos y bovinos.....	102
Cepas de <i>S aureus</i> aisladas de portadores sanos.....	102
Cepas de <i>S aureus</i> aisladas de alimentos.....	106
Cepas de <i>S aureus</i> aisladas de huéspedes humanos, bovinos y de alimentos.....	107
Búsqueda de marcadores moleculares mediante mezclas de ADN.....	107
Optimización de la técnica de PFGE.....	110
Análisis molecular de genes relacionados a virulencia.....	112
Gen <i>spaA</i>	112
Ge <i>coa</i>	114
Gen <i>cfla</i>	115
Gen <i>cap</i>	116
Gen <i>cna</i>	117
Gen <i>sea</i>	118
Gen <i>agr</i>	119
Gen <i>sae</i>	120
Determinación del gen <i>hld</i>	122
Determinación cualitativa de hemolisinas.....	123
Determinación cualitativa de coagulasa.....	124



Discusión

Aislamiento e identificación de cepas de <i>S aureus</i>	125
Caracterización de cepas de <i>S aureus</i> : técnicas convencionales.....	125
Caracterización de cepas de <i>S aureus</i> : técnicas moleculares.....	130
Análisis de cepas de <i>S aureus</i> por RAPD- PCR.....	131
Análisis de cepas de <i>S aureus</i> por REP-PCR.....	134
Marcadores moleculares.....	136
Análisis molecular de genes relacionados a virulencia.....	136
Poder de discriminación.....	141
Asociaciones generales	143
Implicancias.....	144
Conclusiones	146
Referencias.....	147



FIGURAS

Fig. 1: Resolución relativa de diferentes técnicas basadas en el análisis molecular de DNA....	13
Fig. 2: Esquema de las pruebas ensayadas en el sistema de Biotipificación	33
Fig. 3: Representación esquemática para el análisis taxonómico de los datos	40
Fig. 4: Diagrama esquemático del gen de la proteína A	42
Fig. 5: Diagrama esquemático del gen de la coagulasa	43
Fig. 6: Diagrama esquemático del gen de adhesión a fibrinógeno.....	43
Fig. 7: Diagrama esquemático del gen de adherencia a colágeno.....	44
Fig. 8: Diagrama esquemático de los genes <i>agr</i> y <i>hld</i>	45
Fig. 9: Diagrama esquemático del gen <i>sae</i>	46
Fig. 10: Dendrograma comparación de biotipos cepas de <i>S. aureus</i>	51
Fig. 11: Porcentajes de resistencia a antibióticos cepas de huéspedes humanos	56
Fig. 12: Porcentajes de resistencia a antibióticos cepas portadores y de episodios clínicos...	56
Fig. 13: Porcentajes de resistencia a antibióticos en cepas aisladas de huéspedes bovinos...	58
Fig. 14: Perfiles de plásmidos obtenidos según las distintas técnicas.....	59
Fig. 15: Perfiles plasmídicos de cepas de <i>S. aureus</i> - técnica de Takahashi y Nagano.....	60
Fig. 16: Extracción de DNA cromosomal de cepas de <i>S. aureus</i>	61
Fig. 17: Productos de amplificación de cepas de <i>S. aureus</i> por RAPD-PCR.....	62
Fig. 18: Productos de amplificación de cepas de <i>S. aureus</i> por RAPD-PCR.....	63
Fig. 19: Productos de amplificación de cepas de <i>S. aureus</i> por RAPD-PCR	63
Fig. 20: Productos de amplificación de cepas de <i>S. aureus</i> por REP-PCR	66
Fig. 21: Perfiles genotípicos de cepas de <i>S. aureus</i> ensayadas con los distintos cebadores..	69
Fig. 22: Dendrograma de cepas humanas ensayadas con el cebador OLP6.....	72
Fig. 23: Dendrograma cepas de episodios clínicos con el cebador OLP11.....	73
Fig. 24: Dendrograma de cepas de episodios clínicos con el cebador OLP13.....	74
Fig. 25: Dendrograma cepas episodios clínicos con los cebadores OLP6, OLP11 y OLP.....	75
Fig. 26: Análisis de coordenadas principales realizado por RAPD-PCR	76
Fig. 27: Dendrograma de cepas aisladas de mastitis bovina con el cebador OLP6.....	79
Fig. 28: Dendrograma de cepas aisladas de mastitis bovina con el cebador OLP11.....	80
Fig. 29: Dendrograma de cepas aisladas de mastitis bovina con el cebador OLP13.....	81
Fig. 30: Dendrograma cepas mastitis bovina con los cebadores OLP6, OLP11 y OLP13.....	82
Fig. 31: Dendrograma de cepas aisladas de mastitis (Bs. As.) con el cebador OLP13.....	83
Fig. 32: Dendrograma de cepas de mastitis y episodios clínicos con el cebador OLP6.....	85
Fig. 33: Dendrograma de cepas de mastitis y episodios clínicos con el cebador OLP11.....	86
Fig. 34: Dendrograma de cepas de mastitis y episodios clínicos con el cebador OLP13.....	87

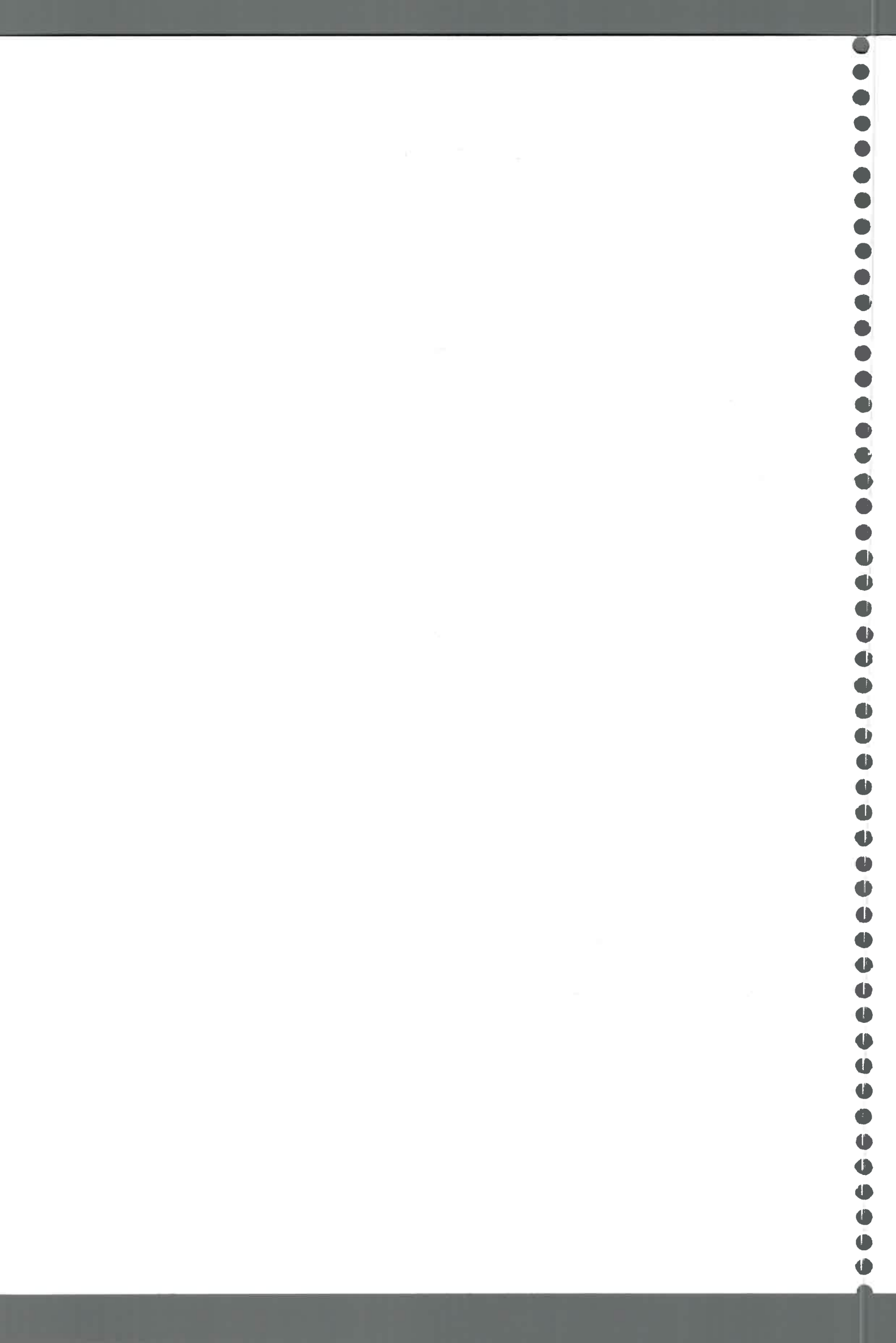
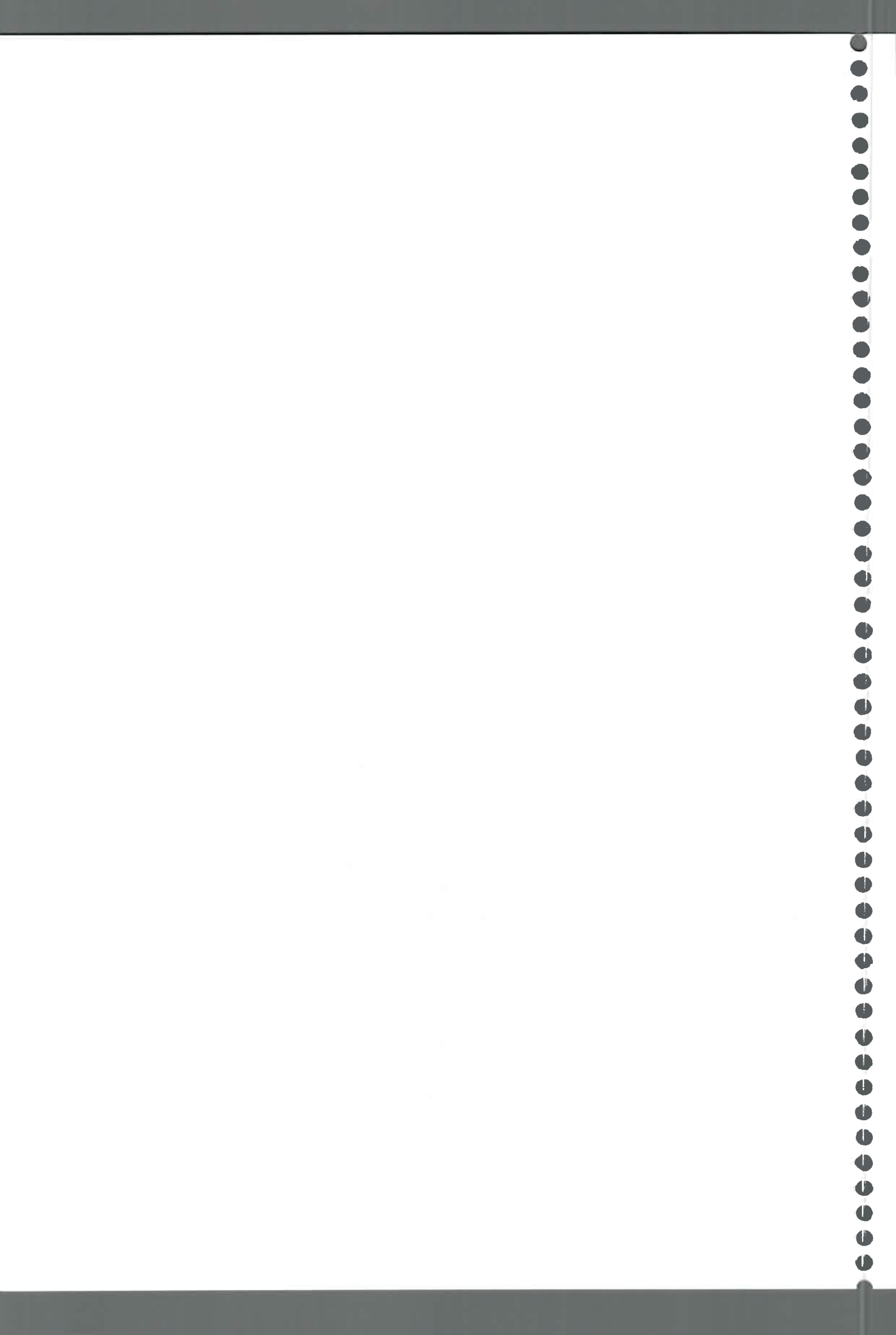
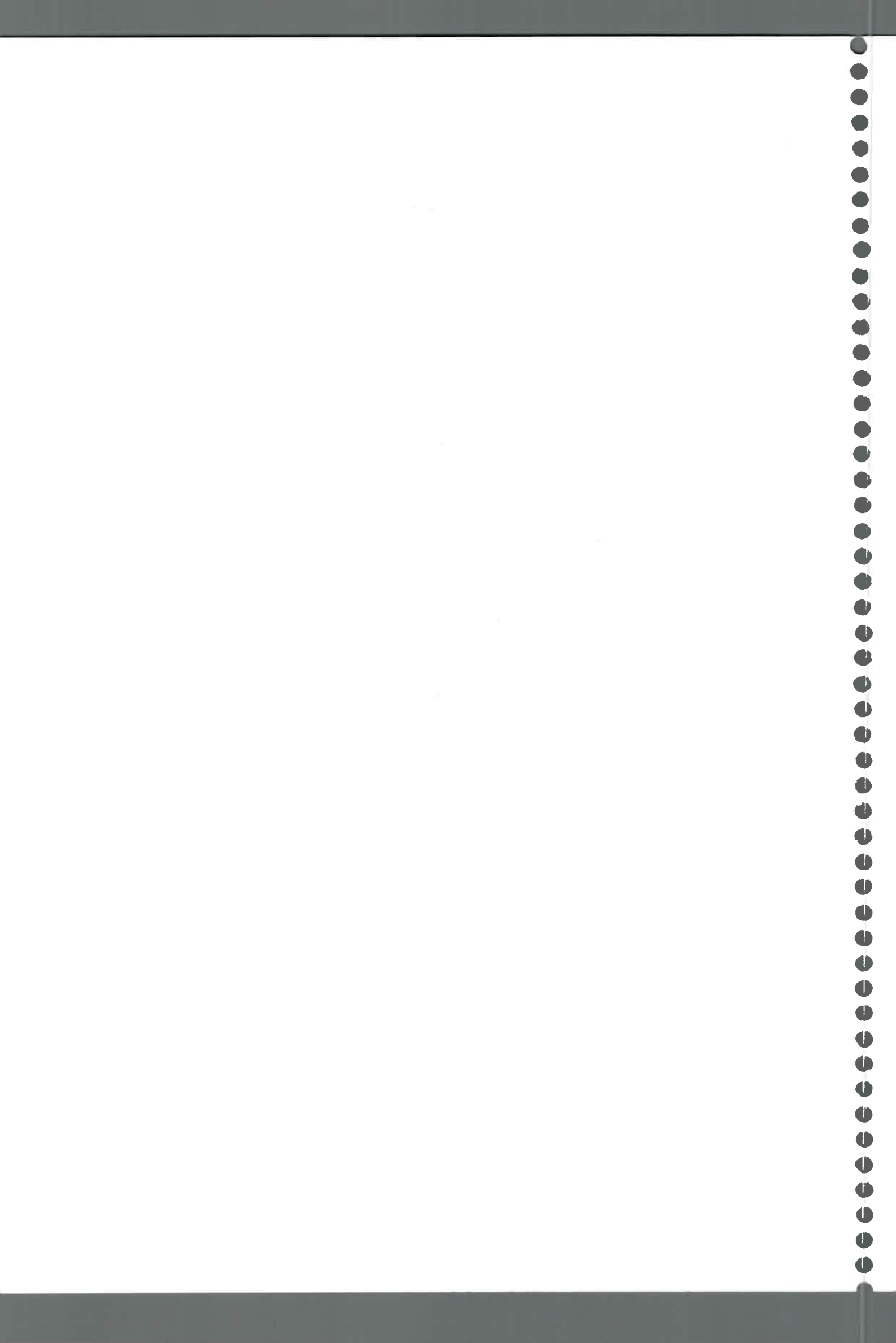


Fig. 35: Dendrograma cepas mastitis y episodios clínicos, OLP6, OLP11 y OLP13.....	88
Fig. 36: Análisis de coordenadas principales realizado por RAPD-PCR.....	89
Fig. 37: Dendrograma de cepas de portadores con el cebador OLP11.....	90
Fig. 38: Perfiles de cepas aisladas de portadores con el cebador OLP11.....	90
Fig. 39: Dendrograma cepas de episodios clínicos y portadores, OLP11 y OLP13	91
Fig. 40: Perfiles de cepas de alimentos ensayadas por RAPD-PCR con el cebador OLP13....	92
Fig. 41: Dendrograma cepas de alimentos, cebadores OLP11 y OLP13.....	93
Fig. 42: Dendrograma cepas de alimentos y de superficies los cebadores OLP11 y OLP13....	94
Fig. 43: Dendrograma de cepas humanas, bovinas y alimentos, cebadores OLP11 y OLP13...	95
Fig. 44: Análisis de coordenadas principales por RAPD-PCR	96
Fig. 45: Perfiles de cepas por REP-PCR.....	97
Fig. 46: Dendrograma de cepas aisladas de episodios clínicos mediante REP-PCR.....	98
Fig. 47: Perfiles de cepas de bovinos ensayadas por REP-PCR.....	99
Fig. 48: Dendrograma de cepas aisladas de huéspedes bovinos mediante REP-PCR.....	101
Fig. 49: Dendrograma de cepas aisladas de episodios clínicos y bovinos mediante REP-PCR..	103
Fig. 50: Perfiles de cepas de <i>S. aureus</i> de portadores por REP-PCR.....	102
Fig. 51: Dendrograma de cepas aisladas de portadores.....	104
Fig. 52: Dendrograma de cepas aisladas de portadores y de episodios clínicos.....	105
Fig. 53: Perfiles de cepas de portadores por REP-PCR.....	106
Fig. 54: Dendrograma de cepas aisladas de alimentos.....	106
Fig. 55: RAPD-PCR a partir de mezclas de ADN.....	108
Fig. 56: Dendrograma de cepas con mezclas de ADN	108
Fig. 57: RAPD-PCR a partir de mezclas de ADN de cepas de <i>S. aureus</i>	109
Fig. 58: REP-PCR a partir de mezclas de ADN de cepas de <i>S. aureus</i>	109
Fig. 59: RAPD-PCR a partir de mezclas de ADN de cepas de <i>S. aureus</i>	110
Fig. 60: Perfiles de cepas ensayados por PFGE.....	111
Fig. 61: Perfiles de cepas por PFGE.	112
Fig. 62: Productos de amplificación a partir de la amplificación del gen <i>spaA</i>	113
Fig. 63: Productos de amplificación del gen <i>spaA</i> región X en cepas de <i>S. aureus</i>	114
Fig. 64: Productos de amplificación del gen <i>coa</i> en cepas de <i>S. aureus</i>	115
Fig. 65: Productos de amplificación del gen <i>clfA</i> en cepas de <i>S. aureus</i>	115
Fig. 66: Productos de amplificación del gen <i>cap</i> en cepas de <i>S. aureus</i>	117
Fig. 67: Productos de amplificación del gen <i>cna</i> en cepas de <i>S. aureus</i>	118
Fig. 68: Productos de amplificación del gen <i>sea</i>	118
Fig. 69: Productos de amplificación del gen <i>agr</i> cepas de <i>S. aureus</i>	120
Fig. 70: Productos de amplificación del gen <i>saeS-saeR</i>	121
Fig. 71: Productos de amplificación del gen <i>saeR</i> en cepas bovinas.....	121
Fig. 72: Perfiles de digestión de los productos de amplificación del gen <i>saeR</i>	122
Fig. 73: Productos de amplificación del gen <i>hld</i> en cepas aisladas de huéspedes humanos...	122
Fig. 74: Hemólisis producida por cepas de <i>S. aureus</i>	123

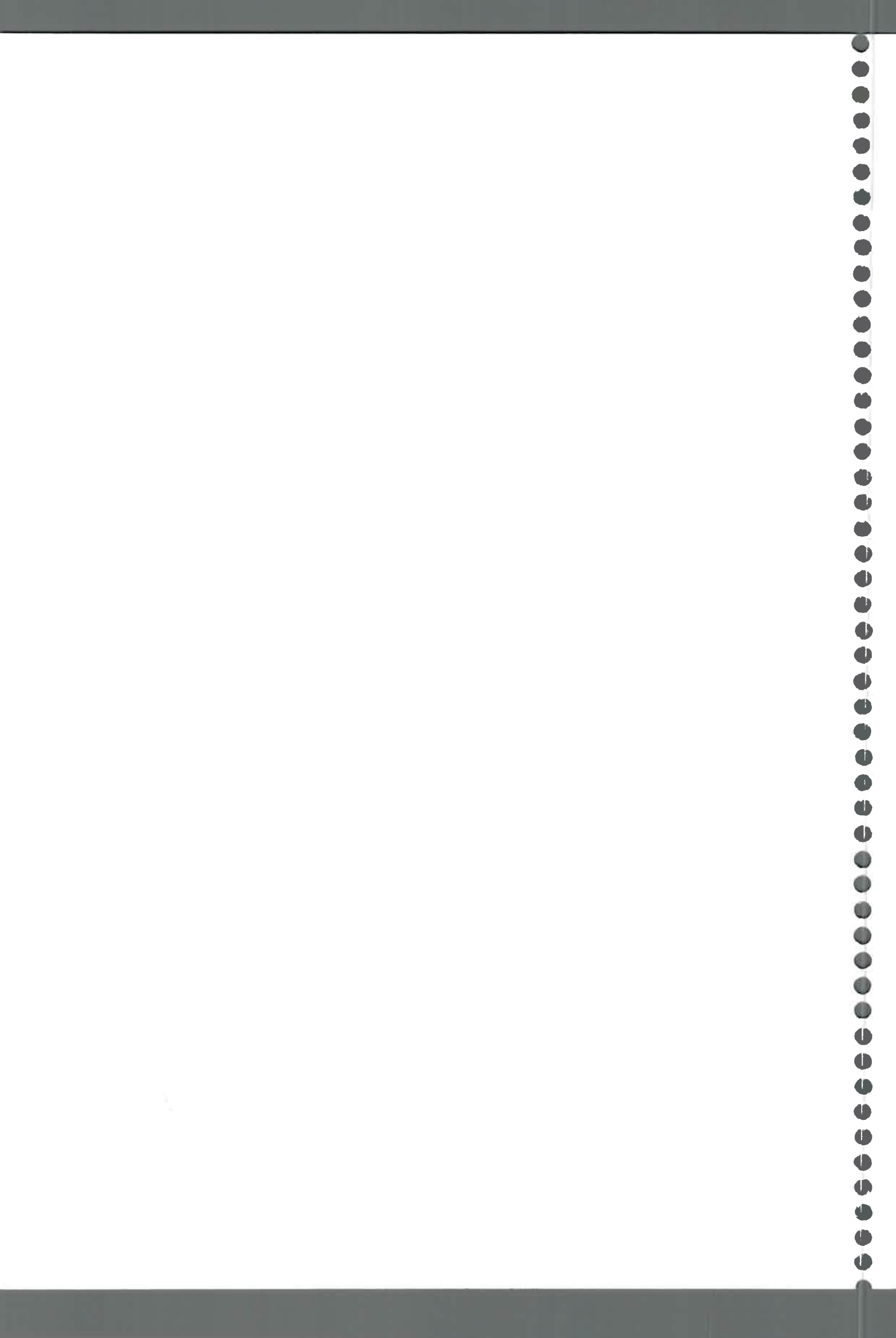


TABLAS

Tabla 1: Cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de distintos orígenes.....	21
Tabla 2: Origen de las cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de infecciones clínicas.....	21
Tabla 3: Origen de las cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de alimentos.....	21
Tabla 4: Número de cepas aisladas de bovinos en cada tambo	22
Tabla 5: Cepas de <i>S. aureus</i> empleadas en el presente trabajo	23
Tabla 6: Cebadores empleados en las reacciones de PCR.....	28
Tabla 7: Clasificación por biotipos.....	33
Tabla 9: Biotipificación de cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de distintos orígenes	49
Tabla 10: Biotipificación de cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de episodios clínicos en humanos.	50
Tabla 11: Biotipificación de cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de vacas con mastitis	50
Tabla 12: Resistencia a antibióticos en cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de huéspedes humanos	53
Tabla 13: Resistencia a antibióticos en cepas de <i>S. aureus</i> aisladas de portadores	54
Tabla 14: Resistencia a antibióticos en cepas de <i>S. aureus</i> aisladas huéspedes bovinos....	54
Tabla 15: Porcentaje de resistencia a antibióticos cepas aisladas de bovinos y humanos....	55
Tabla 16: Perfiles de resistencia a antibióticos-biotipos humano y NE4	57
Tabla 17: Porcentaje de cepas de <i>S. aureus</i> resistentes a metilina	58
Tabla 18: Cebadores ensayados mediante la técnica de RAPD-PCR	66
Tabla 19: Índices de discriminación de los cebadores ensayados por RAPD-PCR	68
Tabla 20: Características genotípicas de las cepas de <i>S. aureus</i>	116
Tabla 21: Clasificación de las cepas de <i>S. aureus</i> de acuerdo al gen <i>agr</i>	119
Tabla 22: Relación presencia de gen <i>sae</i> y hemolisinas α y β	124
Tabla 23: Relación coagulasa y presencia del gen <i>sae</i>	124



Resumen



RESUMEN

Staphylococcus aureus es un agente causal de infecciones en hombre y animales, aunque su nicho ecológico es la flora normal de piel y mucosas de animales. El Objetivo del presente trabajo fue el estudio epidemiológico molecular en base a las relaciones genéticas de 212 cepas de *S. aureus* aisladas de diferentes orígenes (alimentos, mastitis bovina, infecciones y flora normal de humanos) por RAPD-PCR y REP-PCR y su comparación con los resultados obtenidos por técnicas convencionales. El 45% de todas las cepas pudieron asociarse con un biotipo huésped específico. La mayor resistencia a antibióticos encontrada fue para penicilina (45%). Los resultados obtenidos mediante las técnicas moleculares de RAPD-PCR y REP-PCR permitieron diferenciar poblaciones genotípicamente diferentes de acuerdo al origen. Los ensayos con mezclas de ADN permitieron la obtención de bandas fuertes y nítidas diferentes en cada población y diferentes según la virulencia de las cepas ensayadas. El análisis en la distribución de genes asociados a virulencia permitió analizar el estudio de estas diferencias genéticas. La amplificación de la región variable X del gen *spaA* reveló diferencias en el tamaño del fragmento para las cepas humanas y bovinas. El gen *cap5* estuvo presente en cepas humanas y bovinas, mientras que *cap8* no pudo ser hallado en cepas bovinas. Se encontraron diferentes clases de *agr* entre las cepas aisladas de diferentes orígenes, sugiriendo la existencia de polimorfismos en las cepas de *S. aureus* de acuerdo al origen de aislamiento. Los resultados obtenidos al amplificar el gen *sae* muestran que solo el 62% de las cepas ensayadas presentaron fragmentos de amplificación. Los datos estarían indicando que el gen *sae* no se encuentra en todas las cepas ensayadas, o que podría ser polimórfico, por lo que no sería amplificable con los cebadores empleados. En el presente estudio todas las técnicas empleadas arrojaron buenos resultados y en general los datos obtenidos de cada técnica fueron acordes entre sí. Los resultados obtenidos a partir de los genotipos podrían ser importantes para construir bases de datos. Esto permitiría monitorear las cepas de *S. aureus*. Los resultados obtenidos representan un valioso aporte al conocimiento de la epidemiología de *S. aureus* ya que (1) han permitido elucidar relaciones epidemiológicas, (2) contribuyen a la selección de cepas de *S. aureus* con características relevantes para ser utilizadas en el diseño de vacunas contra la mastitis bovina, (3) posibilitan un mejor conocimiento, a nivel fenotípico y genotípico de cepas de *S. aureus* de distintos orígenes y de distintas regiones, (4) contribuyen al estudio de cepas MRSA, gen *sae*, análisis de las bandas posibles marcadores moleculares, los cuales podrían ser de utilidad en esquemas de identificación de cepas de *S. aureus* mediante métodos rápidos.





Introducción



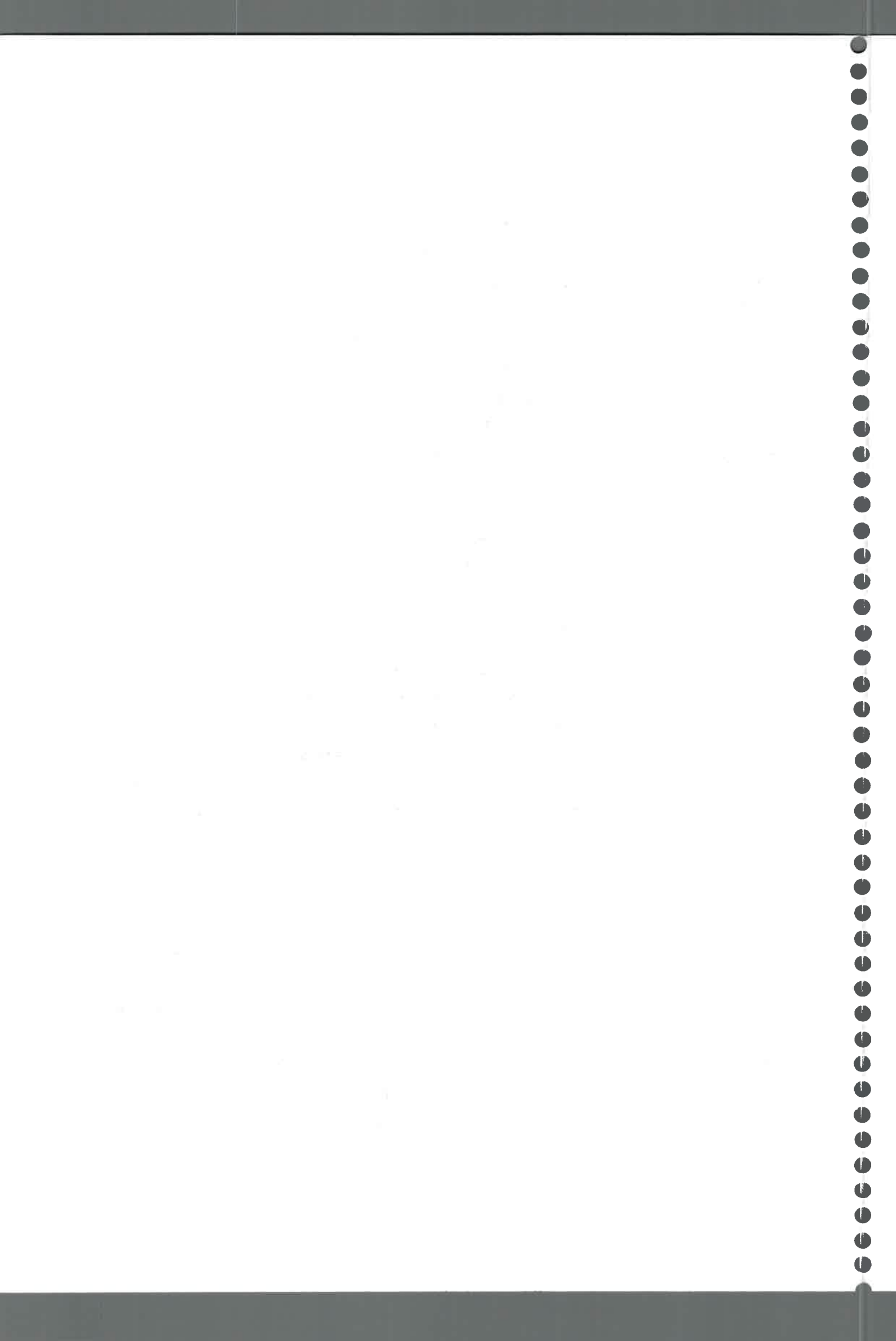
Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus es una bacteria Gram positiva perteneciente a la familia Micrococcaceae capaz de producir infecciones en el hombre y animales. Por otro lado pertenece a la flora normal encontrada sobre la piel y membranas mucosas de mamíferos y aves. Reside normalmente en el colon humano y el principal sitio de colonización en el hombre es la nariz (Kluytams y col., 1997). Los humanos son un reservorio natural de *S. aureus* y la colonización asintomática es más frecuente que la infección. El nicho ecológico de este agente son las narices anteriores. La bacteria puede ser diseminada en el medio y puede sobrevivir por largos períodos de tiempo. La prevalencia e incidencia de portadores nasales de *S. aureus* varía de acuerdo a la población estudiada. En general se ha encontrado un 37.2% de portadores (Kapur y col., 1995).

La identificación de *S. aureus* como patógeno humano fue informado por Ogston en 1881, posteriormente al descubrimiento de los microorganismos por Robert Koch en 1878. En las siguientes décadas fue considerado como el agente más importante en las infecciones nosocomiales ya que puede producir desde un simple absceso a una sepsis fatal (Tenover y col., 1994; Seguin y col., 1999).

Entre las infecciones más frecuentes en animales se destaca la mastitis bovina, que es la inflamación de la glándula mamaria, que puede ser causada por infecciones, lesiones traumáticas, disturbios secretorios de origen metabólico – nutricional, situaciones de estrés o cambios fisiológicos asociados con una terminación temprana de la lactancia. El término deriva de las palabras griegas *mastos*, que significa “pechos” e *itis* que significa “inflamación de”. La enfermedad se presenta con diferentes niveles de intensidad dependiendo del grado de inflamación pudiendo ser clasificados en:

- mastitis clínica, donde la ubre muestra reacción inflamatoria visible, con síntomas característicos que pueden ser locales o sistémicos.
- mastitis subclínica donde no se observan signos clínicos evidentes y la leche parece normal. La forma subclínica es importante porque no solo constituye una reserva de microorganismos sino que también es entre 15 a 40 veces más frecuente que la manifestación clínica.
- mastitis crónica que se caracteriza por la formación de microcolonias dentro de la glándula mamaria, tiene usualmente un desarrollo progresivo de tejido cicatrizante y un cambio en la forma y el tamaño de la glándula afectada.



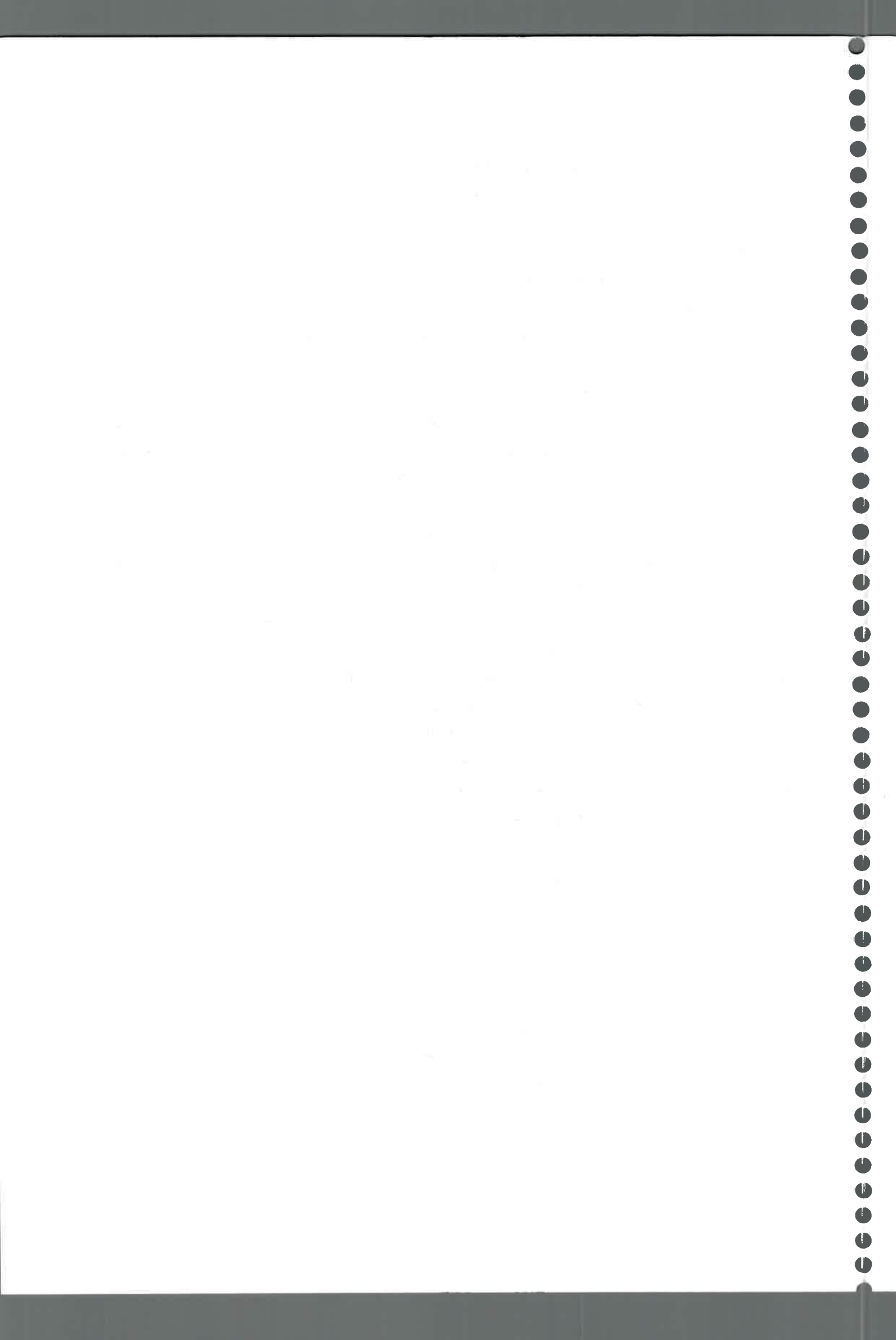
La mastitis ha sido reconocida desde que el hombre domesticó la vaca y a pesar de todo el avance científico, hoy continúa siendo la enfermedad más común y costosa que padece el ganado en el mundo entero (Watts, 1988). Se estima que entre un 15% y un 20% de todas las vacas lecheras están infectadas por alguna forma de mastitis. Dicha enfermedad es generalmente el resultado final de la interacción de varios factores, tales como el manejo de los animales del rodeo, el huésped y los agentes etiológicos pero los más importantes están relacionados con las medidas preventivas de control existentes. Hasta el presente, la desinfección post-ordeño y la terapia con antibióticos al secado son los métodos de control más aceptados, aunque no, los más económicos.

La enfermedad ocasiona grandes pérdidas económicas tanto en la producción como en la industria lechera a consecuencia de la pérdida del valor biológico de la leche, alterando la calidad de los subproductos industrializados (Buddle y Cooper, 1978; Genigeorgis, 1989). Anualmente se pierden, por su causa, cerca de 70 millones de kilogramos de grasa butirosa. Los derivados lácteos permiten, además, el desarrollo de *S. aureus*, lo que ocasiona en el hombre enfermedades transmitidas por alimentos (Tranter y Brehm, 1994; Genigeorgis, 1989).

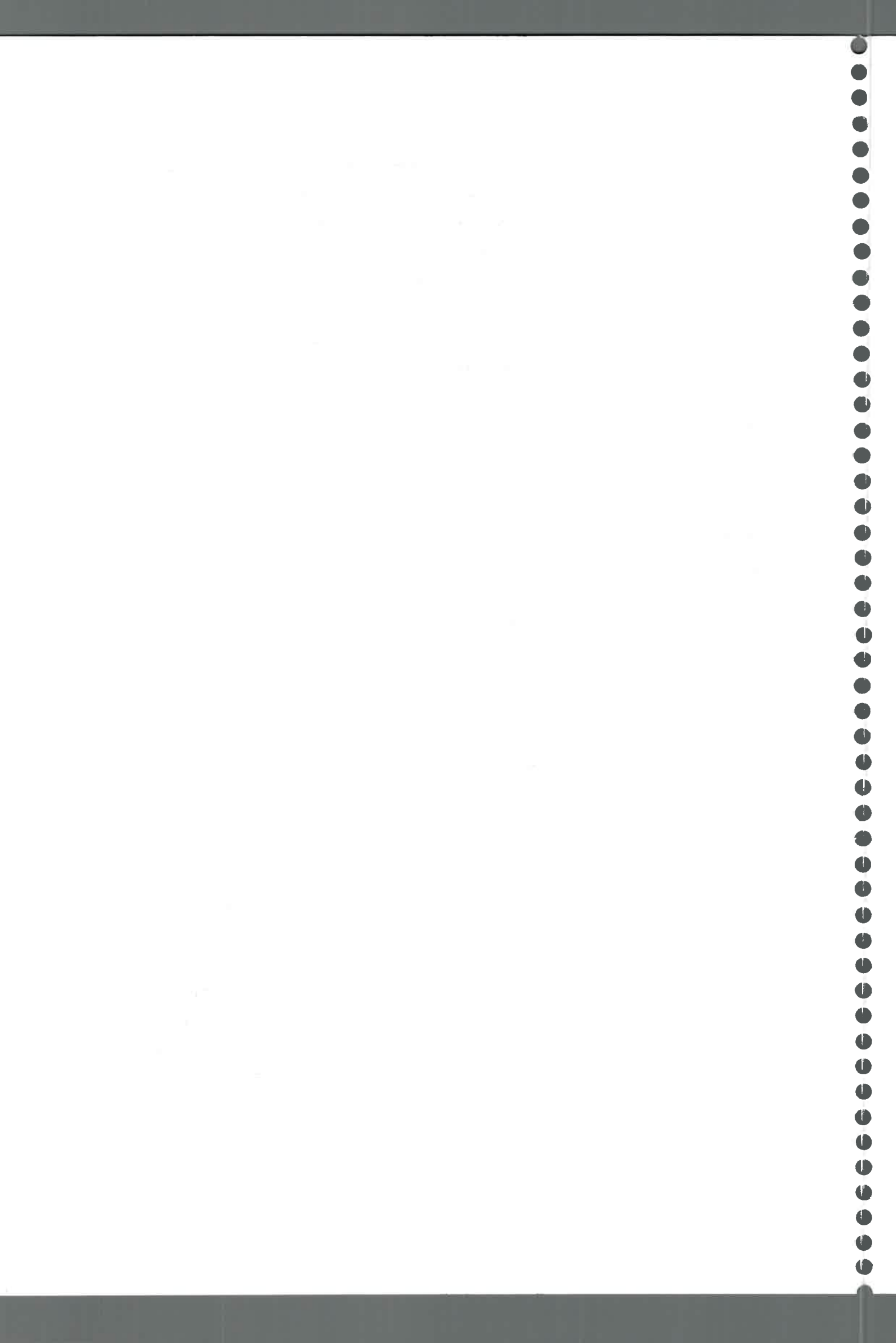
La demanda por una mayor calidad de los productos por parte de las industrias lácteas, ha promovido el desarrollo de líneas de investigación orientadas a la producción de vacunas, como una estrategia de manejo apropiada para controlar las infecciones intramamarias (Giraud y col., 1997; Calzolari y col., 1997; Bogni y col., 1998; Sordelli y col., 2000; Buzzola y col., 2001). Sin embargo, los intentos a nivel internacional para producir una vacuna no han resultado exitosos (Buddle y Cooper, 1978) debido, no sólo a la diversidad de patógenos contagiosos y ambientales que colonizan el epitelio de la glándula mamaria, sino también a la dificultad para generar una respuesta inmune apropiada y efectiva. Varios trabajos relacionados a vacuna han sido desarrollados en Argentina (Giraud y col., 1997; Calzolari y col., 1997; Bogni y col., 1998; Reinoso y col., 2002).

Resistencia a antibióticos

A pesar de la introducción de los agentes antimicrobianos y de las mejoras en la higiene, que han sido fundamentales para reducir la mortalidad de las infecciones estafilocócicas en el siglo XX, los estafilococos han persistido como patógenos importantes en humanos y animales. Un factor importante en esa persistencia es la capacidad que poseen estos microorganismos para desarrollar resistencia a los antibióticos empleados en



su control (Lowy, 2003; Tenover y col., 1994). Durante las últimas décadas, ha generado gran preocupación la aparición de cepas resistentes a numerosos antibióticos y la asociación de estas cepas con brotes epidémicos. La mortalidad de pacientes con bacteriemia a *S. aureus* en la era pre-antibiótica excedía el 80%, la introducción de la penicilina, en la década del 40, mejoró el pronóstico de pacientes con infección estafilocócica. Sin embargo, en 1942, surgieron las primeras cepas resistentes. En 1960 más del 80% de los aislados tanto en la comunidad como en hospitales era resistente a la penicilina (Lowy, 2003). Desde hace unos años, las cepas de *S. aureus* metilino resistentes (MRSA), las cuales emergieron durante la década del 80', están siendo consideradas como un problema clínico adicional, luego del uso clínico indiscriminado de beta-lactámicos. Las primeras cepas MRSA fueron aisladas en Inglaterra en 1961 luego del desarrollo de metilina, la primera penicilina semi-sintética. Desde entonces, las cepas MRSA se han convertido en los patógenos prevalentes causando infecciones nosocomiales en todo el mundo, y la incidencia está creciendo en algunos países. Las cepas MRSA son resistentes a la gran mayoría de los antibióticos beta-lactámicos, representados por penicilinas y cefalosporinas. Los trabajos sobre epidemiología indican que todas las cepas tienen un origen clonal (Musser y Kapur, 1992; Saulnier y col., 1993). La resistencia es causada por la producción de una proteína de unión a penicilina, designada PBP 2' o PBP 2^a, la cual tiene afinidades de unión remarcablemente reducidas a los antibióticos beta-lactámicos. La proteína PBP 2' está codificada por el gen *mecA* localizado en el cromosoma de las cepas MRSA. Dicho gen fue clonado y secuenciado en 1987 (Ito y col., 2001) y está ampliamente distribuido entre cepas de *Staphylococcus coagulasa* positivas como negativas. Esta resistencia a los beta-lactámicos está codificada en un elemento genético móvil, designado "cassette cromosómico de estafilococo *mec*" (SCC*mec*), el cual fue identificado en una cepa MRSA japonesa. SCC*mec* se caracteriza por la presencia de extremos repetidos e invertidos, un grupo de genes recombinasas específicos (*ccrA* y *ccrB*) y el complejo gen *mecA*. Actualmente se han identificado dos tipos de elementos genéticos que codifican el gen *mecA*, los cuales tienen diferencias en tamaño y secuencia nucleotídica (Hiramatsu y col, 2001). Es importante destacar que las cepas MRSA son resistentes a todos los agentes β -lactámicos, incluyendo al amplio espectro de antibióticos usados en larga escala en los hospitales. Esta resistencia se debe a que el gen *mecA* portaría otros elementos genéticos como *Tn554*, pUB110 y pT181, los cuales codifican para resistencias a antibióticos no β -lactámicos, causando multirresistencias (Ito y col., 1998). Por lo tanto el mecanismo de diseminación aumentado bajo presión de selección, en hospitales, podría contribuir al incremento de la prevalencia de cepas MRSA.



Recientemente, se ha informado una resistencia aumentada a vancomicina, único agente terapéutico disponible en la clínica para el tratamiento de cepas multirresistentes. Se conoce que todas las cepas con resistencia a vancomicina son MRSA y que la adquisición del gen *vanA*, responsable de dicha resistencia, ha sido consecuencia de eventos conjugativos con cepas de *Enterococcus faecalis* (Lowy, 2003).

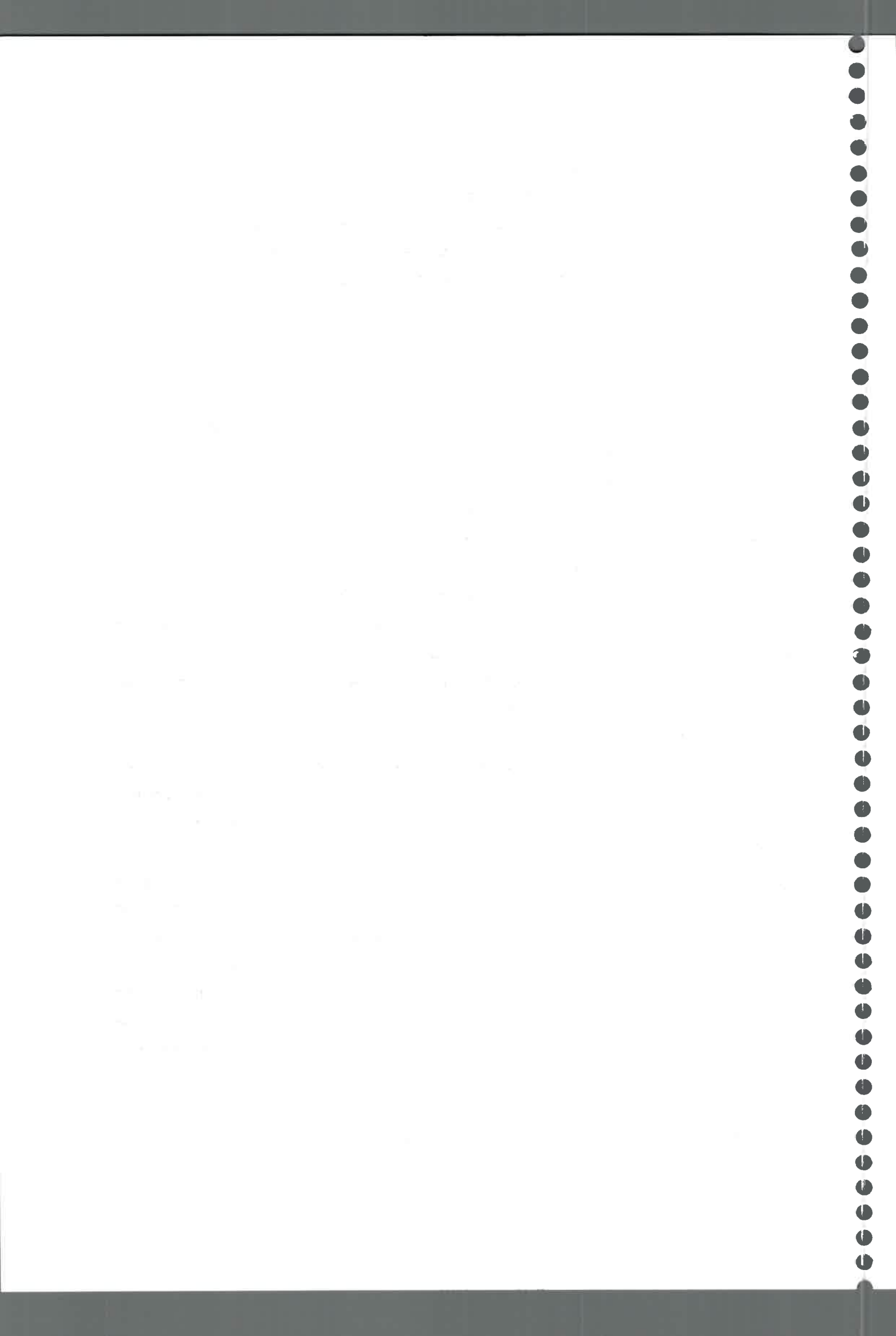
Factores de virulencia

Los microorganismos patogénicos ponen en juego un conjunto de estrategias de supervivencia para colonizar determinados órganos del huésped mediante la adquisición de una variedad de factores de virulencia. Estos permiten a la bacteria evadir las defensas fagocíticas del huésped, facilitar su adherencia a células epiteliales, colonizar los tejidos y favorecer su persistencia extracelular. También se conoce que *S. aureus* es capaz de persistir en el huésped evadiendo la respuesta inmune. Esta observación ha sugerido la internalización de las cepas en células epidérmicas y endoteliales (Almeida y col., 1996). Por otro lado se ha demostrado que es capaz de invadir e inducir la muerte de varios tipos de células mediante la actividad citotóxica (Bayles y col., 1998; Krut y col., 2003).

Entre los factores de virulencia de *S. aureus* se destacan la proteína A, coagulasa, cápsula y adhesinas como las proteínas de adhesión a colágeno y el receptor de fibrinógeno, entre otros.

La proteína A está codificada por el gen *spa*, el cual posee una región polimórfica o variable y una región conservada. La región polimórfica X consiste de un número variable de repetidos de 24 pares de bases y está localizada upstream de la región codificante del extremo C-terminal de la pared celular (Uhlen y col., 1984). La diversidad de la región parece originarse a partir de deleciones y duplicaciones espontáneas de las unidades repetidas como también por mutaciones puntuales. El dominio de la proteína A, codificado por la región X, sirve para extender la porción N-terminal de unión a la inmunoglobulina IgG a través de la pared celular, evitando la fagocitosis y la fijación del complemento (Guss y col., 1984). La existencia de regiones conservadas flanqueando la región X permite el uso de cebadores de PCR para la amplificación y tipificación. La tipificación mediante el gen *spa* es apropiada para el estudio epidemiológico en corto tiempo, ya que el gen tiene una velocidad evolutiva muy grande (Shopsin y col., 1999).

La proteína coagulasa es un importante factor de virulencia en *S. aureus*. La enzima tiene la propiedad de coagular la fibrina, lo que da lugar a que la misma se deposite sobre la



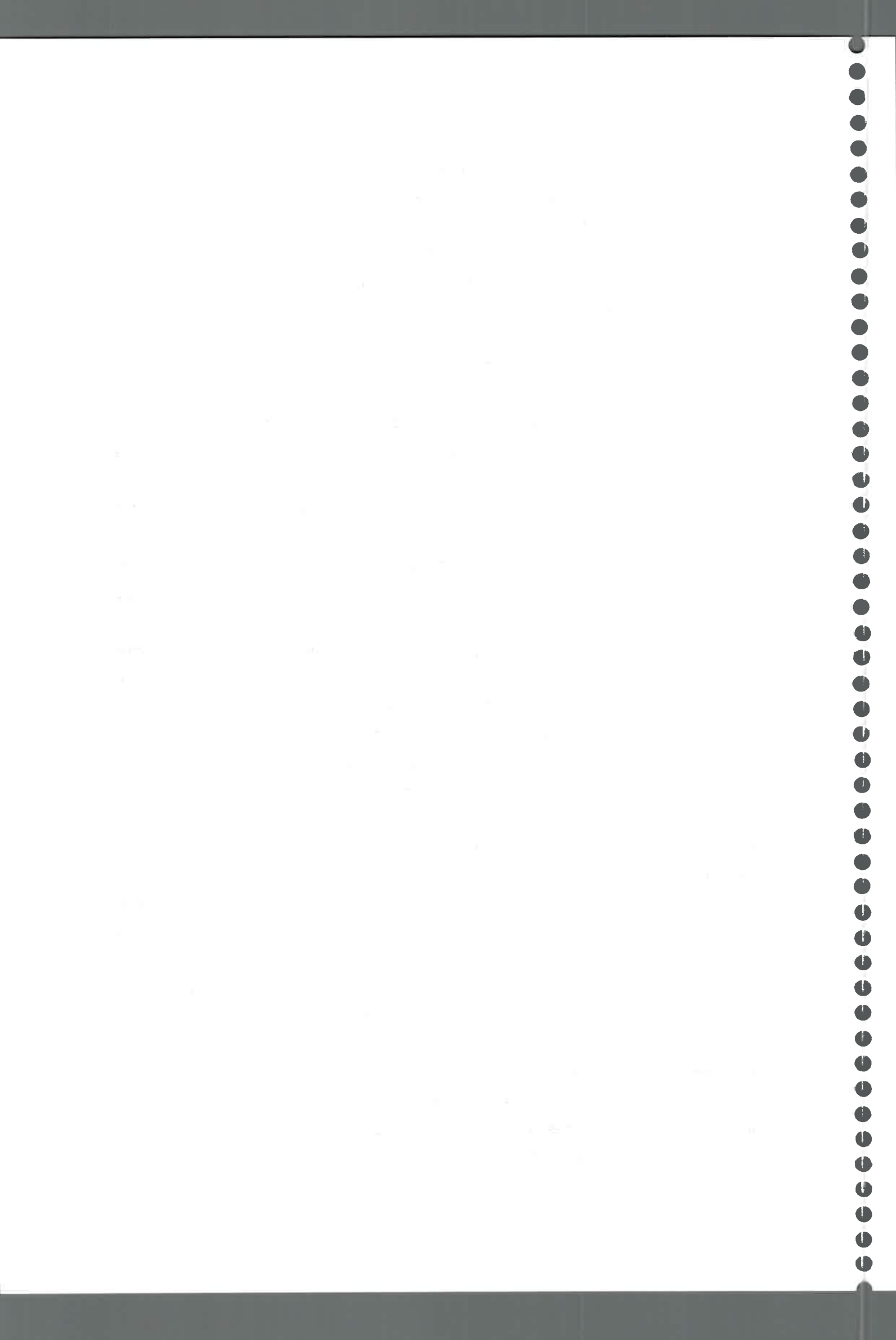
bacteria, ofreciéndole protección contra la fagocitosis. Al igual que el gen *spaA*, el gen *coa* posee una región polimórfica repetida que puede ser usada para diferenciar cepas. La región variable de *coa* comprende secuencias cortas repetidas de 81 pares de bases que son variable en número y secuencia (Goh y col., 1992).

Las cepas de *S. aureus* son capaces de producir polisacáridos capsulares in vivo o bajo definidas condiciones de cultivo. La cápsula es un factor de virulencia demostrado en diferentes modelos animales, ya que inhibe la fagocitosis. Los anticuerpos contra la cápsula han mostrado protección frente a la enfermedad en algunos modelos, como en el ratón (Fattom y col., 1996; Nemeth y Lee, 1995). En la bibliografía se informa que un elevado porcentaje de cepas de *S. aureus* aisladas de distintos huéspedes son capsuladas (Sompolinsky y col., 1985). Se han descrito once tipos de cápsula, aunque los tipos predominantes en cepas aisladas de huésped humano son los tipo 5 y 8. Una prevalencia variable del tipo de cápsula se ha encontrado en cepas bovinas aisladas de diferentes regiones geográficas del mundo.

Las adhesinas son consideradas los factores de virulencia más importantes en las fases tempranas de la infección, ya que son las responsables de la unión del microorganismo en la célula huésped. Entre ellas se destacan la fibronectina, laminina, elastina, osteoporina, sialoproteínas y colágeno. Las adhesinas se denominan componentes microbianos de superficie reconocedores de moléculas adhesivas en la célula huésped (denominados MSCRAMMs). Cada uno de estos MSCRAMMs se caracterizan por tener una especificidad por una única proteína de huésped (Gillaspy y col., 1998). Por ejemplo, la habilidad de *S. aureus* de unirse a fibrinógeno y fibrina se debe a la presencia del gen *clfA* que codifica para el receptor de fibrinógeno. Por otro lado, el gen *cna* codifica una adhesina que solo se une a colágeno de la célula huésped. En la bibliografía se describe que los genes que codifican para adhesinas en distintas especies bacterianas se encuentran en islas de patogenicidad (Hacker y col., 2000).

S. aureus también es un importante patógeno debido, en parte, a la producción de exotoxinas, las cuales funcionan como superantígenos (SAGs). Estas exotoxinas incluyen la toxina del síndrome del shock tóxico (TSST-1) y nueve variantes inmunológicas (A-L). Las mismas están involucradas en la modulación de la respuesta inmune del huésped y podrían contribuir a la evasión de la defensa y a la persistencia bacteriana. Los genes codificantes de SAGs están generalmente asociados a elementos genéticos móviles, tales como islas de patogenicidad, fagos y plásmidos (Fitzgerald y col., 2001).

La expresión de las proteínas extracelulares está sujeta a la regulación coordinada de varios *loci*. El primero en descubrirse y más caracterizado es el regulador *agr*, el cual involucra cinco genes (*agrA*, *agrB*, *agrC*, *agrD* y *hld*). El sistema *agr* actúa como un



regulador positivo de proteínas secretorias como α , β y δ hemolisinas, proteasa, DNAsa, estafiloquinasa y toxina del síndrome del shock tóxico, por otro lado reprime la transcripción de los genes que codifican para la proteína A, coagulasa y otras proteínas asociadas a pared. Otro regulador caracterizado es el locus *sar*. La mutagénesis del gen *sarA* mediante la inserción de un transposón, disminuye la producción de α y β hemolisinas y aumenta la expresión de proteína A y otras proteínas de unión (Novick y col., 1993).

En el laboratorio de genética microbiana se ha aislado y caracterizado un tercer regulador, designado *sae* (Giraudo y col., 1994-2003). La inactivación de dicho gen produce disminución de α y β hemolisinas, DNAsa y coagulasa. Los análisis realizados en el laboratorio han mostrado que el gen *sae* inactiva la producción de exoproteínas involucradas en la virulencia a nivel transcripcional. El locus *sae* ha sido mapeado por hibridación mediante ensayos de electroforesis en campos pulsantes en *S. aureus*, determinando que el mismo se halla en el fragmento D. El análisis de secuencia del fragmento clonado, reveló la presencia de dos genes, *saeR* y *sa eS*, los cuales codifican un regulador de respuesta y una proteína histidina quinasa respectivamente, con alta homología a los sistemas regulatorios de dos componentes (Giraudo y col., 1999). Actualmente se conoce que los determinantes de virulencia de *S. aureus* están coordinados por varios loci cromosomales no relacionados. Un nuevo locus regulador se denomina *mgr* y los estudios realizados sugieren que este locus podría regular otros genes (Luong y col., 2003). El locus *sae* contiene un circuito de autoinducción, lo cual sugiere que dicho locus se encuentra debajo de *agr* en la vía de activación de exoproteínas y que estaría coordinado por los efectos de señales ambientales con el sistema *agr quorum-sensing* y además sería una llave intermediaria en la estrategia de regulación general en la cual *S. aureus* sensa y responde al ambiente (Novick y Jiang 2003; Steinhueber y col. 2003).

Los mecanismos involucrados en la virulencia de bacterias patógenas como los determinantes de resistencia a antibióticos son temas importantes en la microbiología clínica. Martínez y Baquero (2002) en un trabajo reciente, analiza la relación entre virulencia y resistencia a antibióticos, considerando que ambos son mecanismos de adaptación seleccionados para sobrevivir bajo condiciones de estrés y que pueden ser adquiridos mediante transferencia horizontal en la mayoría de los casos.



Importancia de la tipificación

Una estrategia racional y efectiva para el control de las infecciones intramamarias debería estar dirigida contra los clones que causan enfermedad (Olive y Bean, 1999). Para controlar la diseminación de las infecciones estafilocócicas, deben identificarse fuentes de contaminación y mecanismos de transmisión. Los organismos clonalmente relacionados son miembros de una misma especie que comparten factores de virulencia, características bioquímicas y genéticas y descienden de una célula precursora común. Sin embargo, la diversidad existente a nivel de especie hace que los microorganismos aislados de diferentes fuentes a distintos tiempos y en distintas regiones geográficas puedan ser diferenciados en subtipos o en cepas. Entonces para conocer si dos cepas están relacionadas clonalmente, es necesario tipificarlas. Desde el punto de vista epidemiológico el proceso de tipificación es importante para reconocer fuentes de brotes alimenticios, detectar transmisión cruzada de patógenos nosocomiales, determinar la fuente de infección y particularmente, reconocer cepas virulentas con el fin de hacer vigilancia epidemiológica y monitorear programas de vacunación (Olive y Bean, 1999). Los mecanismos que generan diversidad son: la transferencia horizontal de genes y las mutaciones, entre otros.

El entendimiento de las relaciones entre aislados bacterianos requiere un vocabulario propio. A continuación se presentan los términos más frecuentemente usados en epidemiología microbiológica según van Belkum y Verbrugh (1997).

Sistema de tipificación

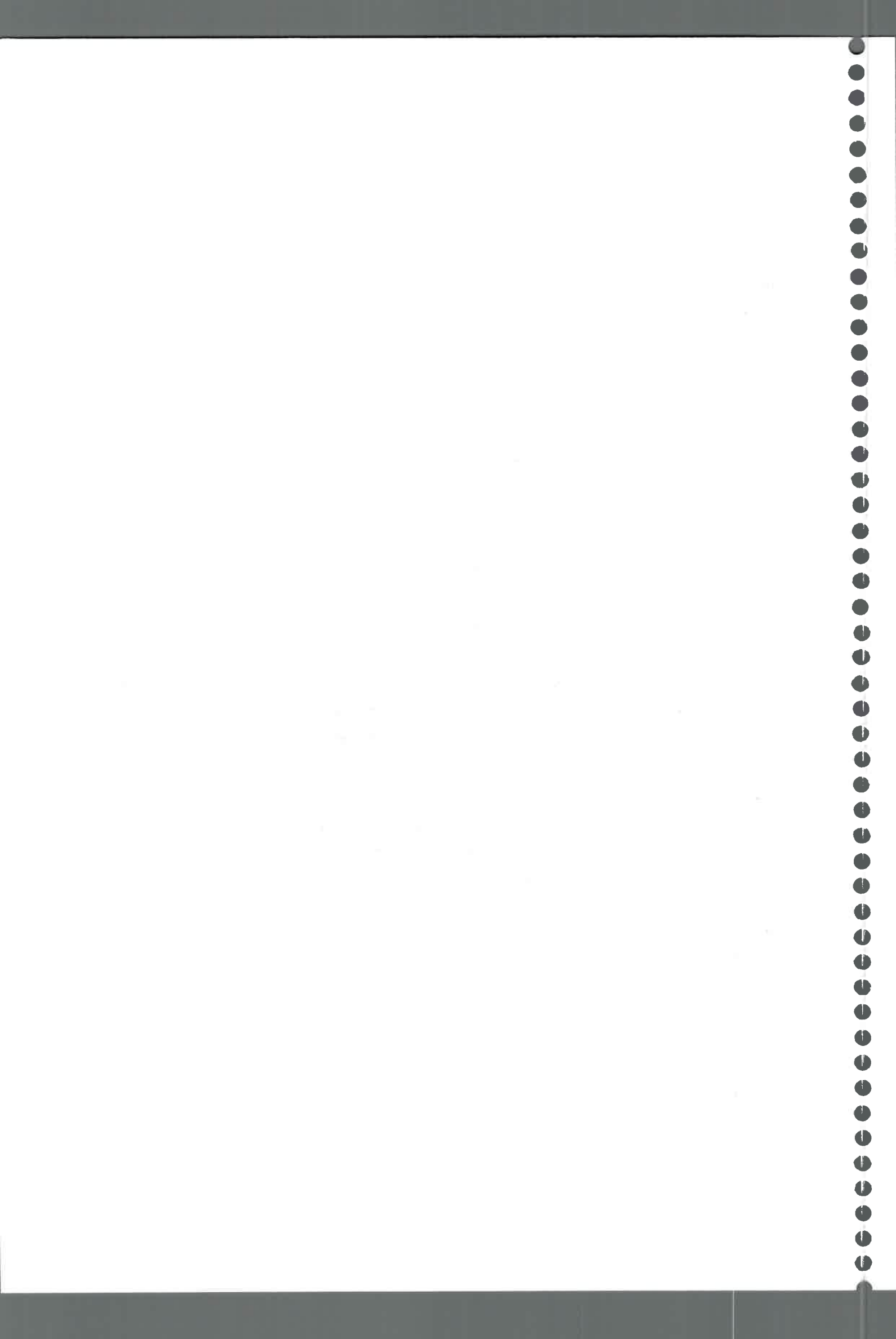
Es el sistema usado para (1) discriminar entre aislados no relacionados epidemiológicamente pertenecientes a una sola especie o taxón, basado en marcadores fenotípicos o genotípicos; (2) reconocer relaciones cercanas entre cepas provenientes de un solo ancestro.

Aislado bacteriano

Constituye una población de bacterias en un monocultivo proveniente de un material clínico primario, identificado a nivel de especie.

Cepa

Un aislado o grupo de aislados que muestran características distintivas de otros aislados de la misma especie.



 Cepa de referencia

Una cepa suficientemente caracterizada y preservada para estudios genéticos.

 Tipo

Un conjunto de marcadores exhibidos por una cepa según un sistema de tipificación particular.

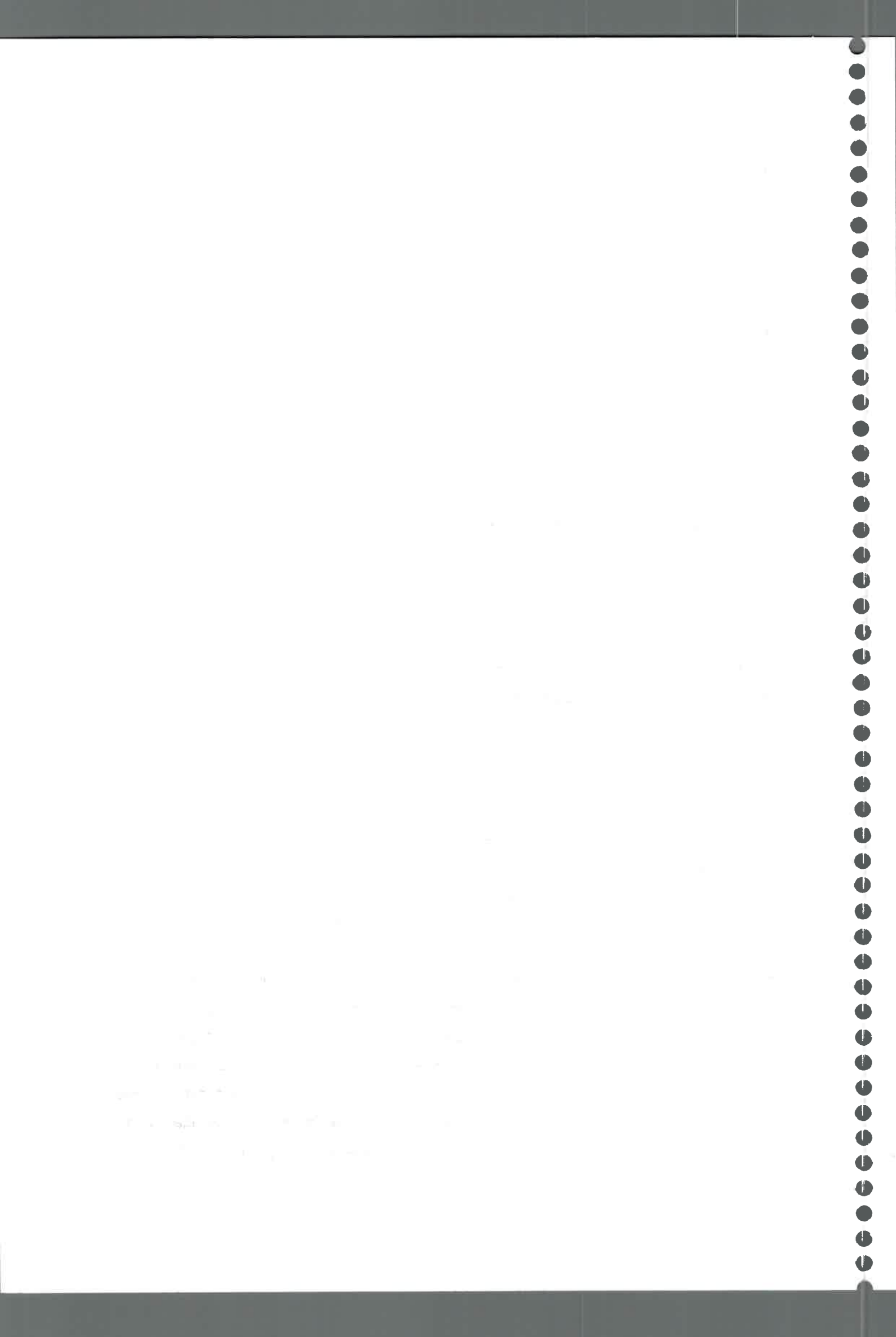
 Clon

Un grupo de aislados que descienden de un ancestro común como parte de una cadena directa de replicación y transmisión de huésped a huésped o del ambiente al huésped.

Métodos fenotípicos versus moleculares

Una variedad de métodos fenotípicos tales como fagotipificación, sensibilidad a antibióticos, biotipificación, electroforesis con enzimas multilocus y ecotipo, entre otros, han sido ampliamente usados para estudiar diversidad en investigaciones epidemiológicas en infecciones humanas y animales (Hájek y Marsálek, 1971; Baumgartner y col., 1984; Devriese, 1984; Carrol y Francis, 1985; Kreiswirth y col., 1993). El sistema propuesto por Devriese (1984) es un método simplificado para la tipificación de cepas en diferentes especies animales. El mismo propone ecovares que se diferencian en ecotipos específicos, como humano, bovino y aviar, y biotipos no específicos. Los ecovares pueden distinguirse por características bioquímicas como producción de estafiloquinasa (fibrinolisisina) y citolisinas (β hemolisinas), coagulación de plasma bovino y tipo de crecimiento en medio conteniendo cristal violeta. Este método es un sistema simplificado para la biotipificación de las cepas procedentes de diferentes especies animales. La técnica de biotipificación en *S. aureus* ha sido útil en estimar el origen de este microorganismo en varios productos alimenticios en la industria y también en infecciones epidemiológicas de brotes alimentarios (De Buyser y col., 1987; Rosec y col., 1997; Bertolatti y col., 2003; Hennekinne y col., 2003).

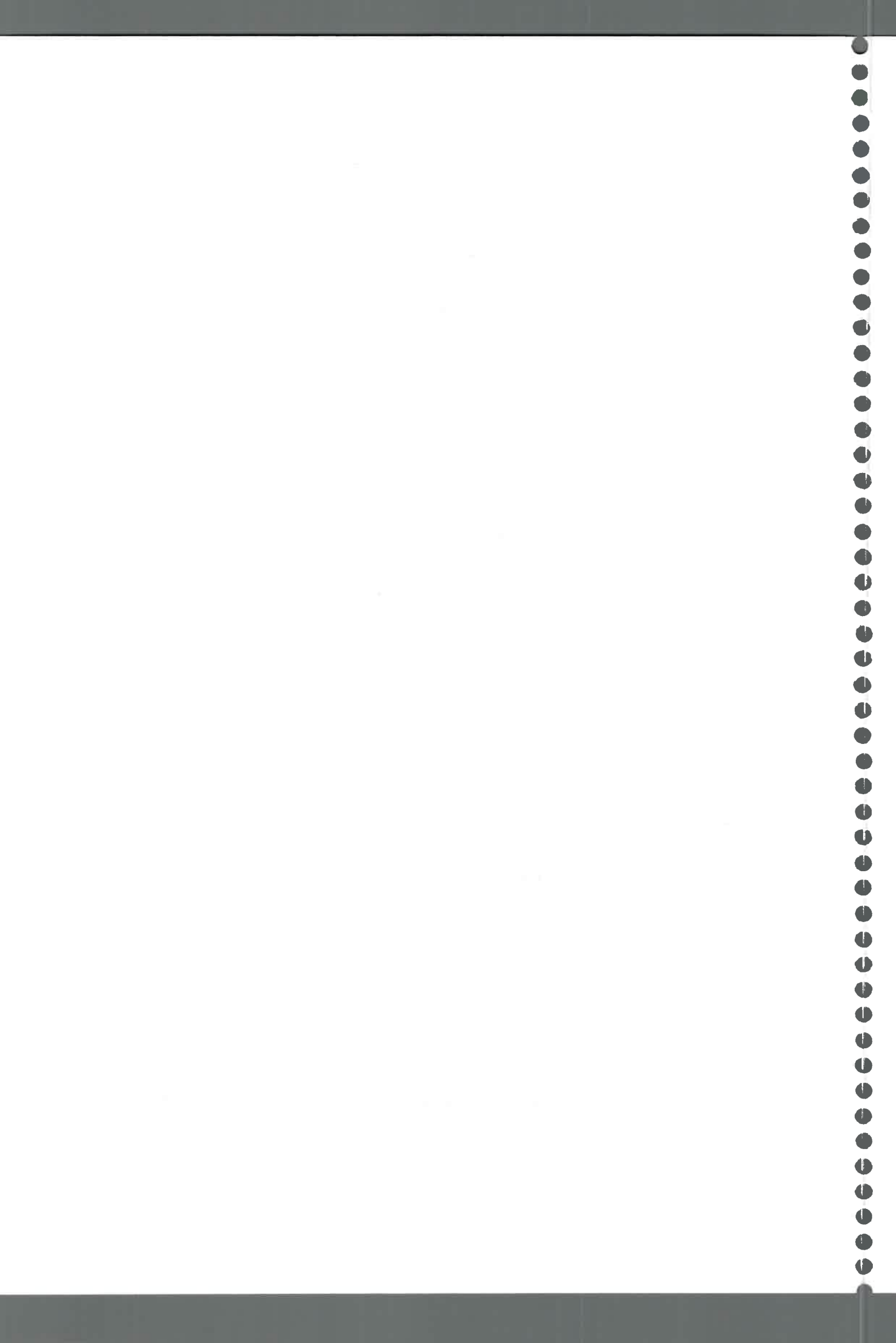
Sin embargo, la elevada variabilidad fenotípica de *S. aureus* ha dificultado la adopción de éstos sistemas convencionales. Ninguno de los sistemas utilizados ha provisto de información clara y definitiva. Además se ha informado que los resultados de estas técnicas están sujetos a cambios a lo largo del tiempo (Tenover y col., 1994). Estos inconvenientes han conducido al desarrollo de nuevas técnicas, más rápidas y confiables, basadas en la tecnología del DNA. La mayoría de las técnicas moleculares actualmente usadas para tipificación, se basan en la separación electroforética en geles de agarosa de fragmentos de DNA de distinto peso molecular. Este resultado está representado mediante



un perfil de bandas en un gel donde cada banda es un marcador molecular (Dieffenbach y Dvesksler, 1995). Entonces los aislados epidemiológicos relacionados tendrán un perfil genómico indistinguible de los aislados no relacionados o al azar de la misma especie. La epidemiología molecular en el campo de las enfermedades infecciosas, apunta a la detección de polimorfismos genéticos entre cepas de microorganismos de importancia clínica. Las relaciones genéticas pueden ser establecidas entre cepas sobre la base de medidas de heterogeneidad genética. El conocimiento de estas relaciones es de gran utilidad en el área de la epidemiología.

Un significativo avance en la tecnología del DNA se produjo a principios de la década de 1990, cuando Williams y col. (1990) y Welsh y McClelland (1990) simultáneamente desarrollaron una estrategia basada en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) mediante el uso de perfiles de fragmentos de DNA amplificados usando un cebador determinado. La reacción en cadena de la polimerasa es una potente herramienta de biología molecular, que puede ser usada para la identificación de especies y cepas de diversos microorganismos. La amplificación de determinados genes (por ejemplo los genes que codifican moléculas de RNA ribosomal) y el análisis genético de los fragmentos amplificados, como así también la información filogenética y sistemática puede ser obtenida de manera rápida y eficiente. La PCR también puede ser usada para detectar genes responsables de características fenotípicas, mientras que las técnicas derivadas de esta reacción permiten la búsqueda de polimorfismos genéticos en todo un genoma. En las ciencias médicas, el análisis por PCR de un gen o de todo un genoma, ha tenido especialmente un gran impacto en el estudio de la diseminación de microorganismos multirresistentes.

Una técnica derivada es la amplificación al azar de DNA polimórfico (RAPD-PCR), basada en el uso de cebadores simples de secuencia arbitraria, de 9 a 10 pares de bases de longitud, en una reacción de baja especificidad para amplificar fragmentos genómicos de DNA (Versalovic y col., 1991). El ensayo de RAPD-PCR en algunas instancias detecta cambios simples de bases en el DNA genómico. Esta estrategia permite la detección de polimorfismos en forma rápida y el análisis de un alto número de cepas. Estos polimorfismos son de utilidad para discriminar entre individuos relacionados, realizar estudios de diversidad genética, determinar relaciones genéticas, construir mapas de genes, realizar mejoramiento vegetal, obtener marcadores de DNA y realizar el análisis genético de poblaciones (Welsh y McClelland, 1990).



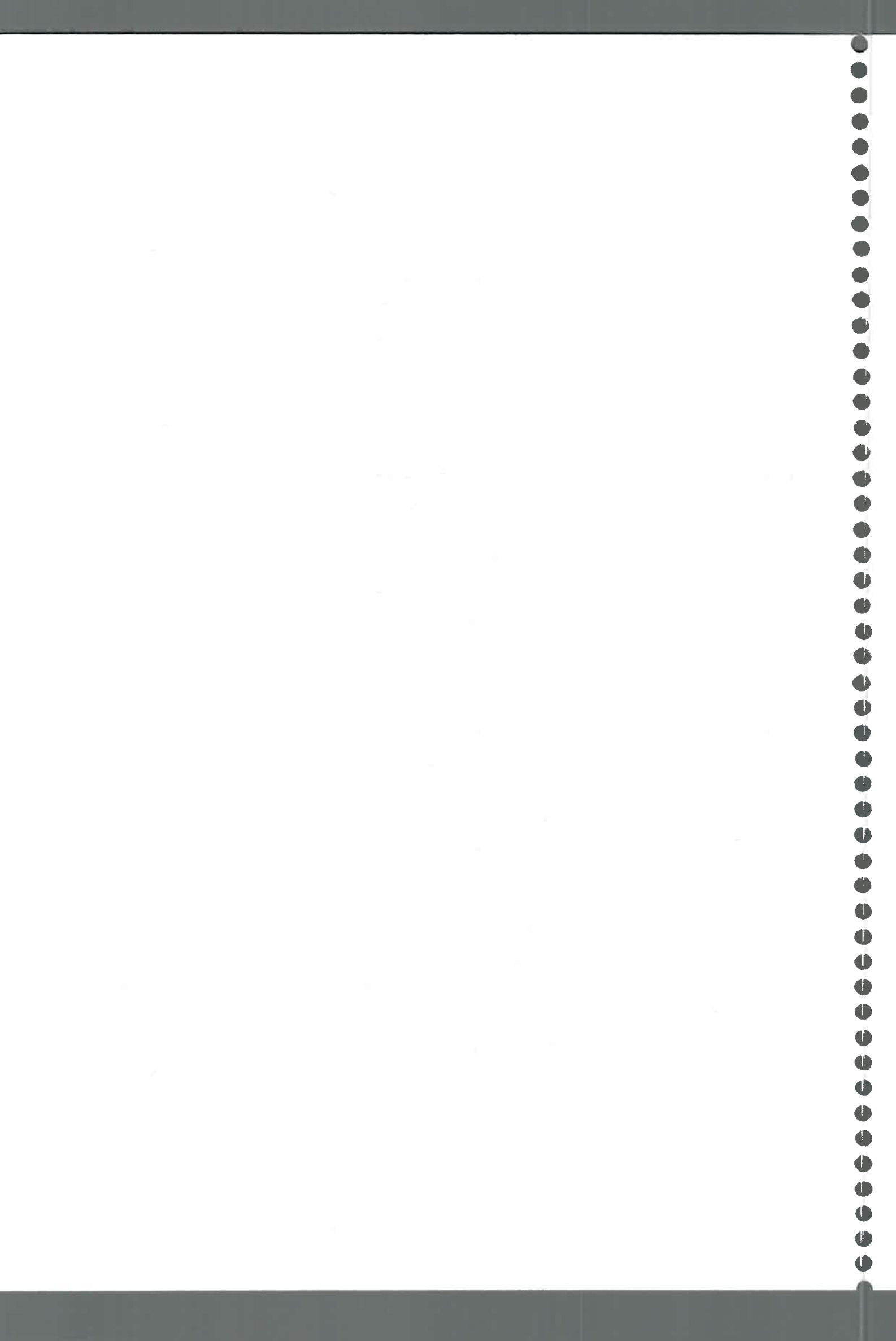
En 1991 Versalovic y col. (1991) describió un método denominado REP-PCR para la tipificación de genomas bacterianos mediante una amplificación por PCR de elementos repetitivos. Los elementos repetidos consisten de secuencias poliméricas simples de un solo nucleótido, como por ejemplo poli A, poli G, poli T o poli C o de un número pequeño o grande de multímeros repetidos. Los multímeros repetidos de DNA pueden estar formados por unidades idénticas, unidades mixtas o secuencias repetidas degeneradas. En el genoma se encuentran cientos de copias de estas secuencias repetidas. Estos elementos se caracterizan por mostrar hipervariabilidad entre cada cepa, por lo tanto los perfiles de DNA son específicos para cada cepa (van Belkum y col., 1998).

La amplificación de este tipo de secuencias se lleva a cabo con cebadores altamente conservados, de secuencias repetidas presentes tanto en bacterias Gram positivas como Gram negativas. Se han identificado tres familias de secuencias repetitivas (*rep*), ellas son: REP (secuencias repetidas extragénicas palindrómicas) de aproximadamente 35 - 40 pares de bases.

Otra familia de repetidos comprende las secuencias ERIC (consensos intergénicos repetidos de enterobacterias) de aproximadamente 124 - 127 pares de bases, las cuales contienen repetidos invertidos centrales altamente conservados y están localizados en regiones extragénicas del genoma bacteriano.

La tercer familia de elementos *rep* está constituida por elementos BOX, usados para la tipificación de *Streptococcus pneumoniae*. Están formados por tres subunidades boxA, boxB y boxC. La técnica es fácil de realizar, puede ser aplicada para el análisis de gran cantidad de muestras y posee un buen poder de discriminación (Del Vecchio y col., 1996). Actualmente también se han encontrado secuencias repetidas en elementos extracromosomales (van Belkum y col., 1998).

Todos estos elementos se caracterizan por tener secuencias altamente conservadas en los extremos y secuencias variables hacia adentro. La variabilidad puede estar asociada a la estructura terciaria de los repetidos de DNA, la cual permite un apareamiento erróneo de los repetidos vecinos y dependiendo de la orientación de la hebra los repetidos pueden ser insertados o lesionados durante la duplicación. Alternativamente, podría asociarse a la recombinación entre múltiples *loci* de secuencias repetidas homólogas. Estas secuencias repetidas son capaces de formar estructuras tallo-rizo y su función genética parecería estar relacionada con la regulación genética, jugando un rol en la terminación transcripcional o como sitios de procesamiento de RNA III, ya que en eucariotas están relacionados con funciones regulatorias (Stern y col., 1984) e involucradas con ciertas enfermedades como el cáncer.



Otra función posible parecería estar relacionada con la estructura y organización cromosomal, posiblemente sirviendo como sitio de unión para proteínas específicas (Stern y col., 1984). Por otro lado, en la bibliografía se informa que el apareamiento erróneo de las secuencias repetidas vecinas es un requisito para los mecanismos de reordenamiento genético como la variación de fase y la adaptación bacteriana.

Informes recientes describen una asociación entre clases únicas de elementos REP y la integración de estos elementos en secuencias del huésped (Oppenheim y col., 1993).

Otra técnica molecular es la electroforesis por campo pulsado (PFGE) que posee la capacidad de separar fragmentos de DNA mayores de 25 kb, mediante la alternancia del ángulo del campo eléctrico. Este método ofrece ventajas sobre otras técnicas de tipificación de *S. aureus*, ya que se ha determinado una alta sensibilidad y reproducibilidad y está siendo analizado su uso en estudios de brotes nosocomiales. Por su elevada resolución es considerado el "método de oro" dentro de los métodos de tipificación molecular (Bannerman y col., 1995; Olive y Bean, 1999).

Actualmente la metodología aplicada a las regiones repetidas ha demostrado ser útil para la tipificación molecular de aislados clínicos en diferentes bacterias. Sabat y col. (2003) ha adoptado el método para la tipificación molecular de cepas MRSA sugiriendo que el método permite la tipificación de cepas de *S. aureus* con el mismo poder de discriminación y reproducibilidad que la electroforesis de campos pulsantes.

Uno de los avances más importantes en los últimos años en tipificación molecular fue el análisis de las secuencias variables de los repetidos en tandem (VNTR) en distintos loci de virulencia. El número de unidades repetidas en el mismo *locus* siempre varía de cepa en cepa y puede ser detectada por PCR. La amplificación de regiones repetidas de diferentes genes, tales como coagulasa (*coa*), proteína A (*spaA*), receptor de fibrinógeno (*cfIA*) y adhesión a colágeno (*cna*) son actualmente usadas para una tipificación confiable y precisa. La tipificación del gen *spaA* es especialmente importante para la tipificación rápida de cepas MRSA, ya que ofrece una mayor resolución que la tipificación mediante el gen *coa* (Shopsin y col., 2000).

Si bien los métodos de tipificación no son 100% resolutivos, cabe destacar que las cepas bacterianas van sufriendo eventos de mutación a medida que se propagan en distintos ambientes. En función de esto es importante reconocer que no existe una técnica de tipificación que permita una diferenciación definitiva (a excepción del secuenciamiento del genoma completo) debido a que las cepas podrían estar mutando continuamente. No



obstante es de fundamental importancia establecer los criterios de utilización de estos métodos para que los resultados obtenidos sean reproducibles y precisos.

Criterios de utilización de diferentes métodos de tipificación

Los métodos fenotípicos y genotípicos usados para la tipificación de cepas deben compartir varios criterios para poder ser eficazmente aplicados. El primer criterio a considerar es que todos los microorganismos a estudiar deben ser "tipificables" por el método a usar. La tipificación es el porcentaje de diferentes cepas bacterianas a las cuales se les puede asignar un marcador positivo. Para algunos métodos fenotípicos, tales como aquellos basados en reacciones con anticuerpos o en la presencia de un receptor para bacteriófago, las características particulares podrían no estar presente en todos los miembros de la especie, por lo que en ausencia de un marcador, algunas cepas podrían no ser tipificables. El segundo criterio a tener en cuenta es el "poder de discriminación". El método debe ser capaz de diferenciar claramente cepas no relacionadas. La discriminación es importante porque algunos sistemas de tipificación tienden a agrupar organismos en grandes grupos, mientras otros agrupan grandes colecciones en pequeños "clusters". El tercer criterio es la "reproducibilidad" de la técnica, que se refiere a la capacidad de obtener un mismo resultado cuando una cepa es ensayada repetidas veces. Este criterio es esencialmente importante para la construcción de bases de datos confiables. Un sistema de tipificación también es influenciado por la estabilidad genética de los aislados. Un tipo de cepa debe ser estable aún después de la manipulación en el laboratorio (Olive y Bean, 1999). El cuarto criterio a considerar es el costo de la técnica, la misma debe tener un bajo costo.

Los métodos fenotípicos y genotípicos permiten un cierto nivel de clasificación filogenética, desde género, especie, subespecie y biovar hasta nivel específico de cepa. Sin embargo las ventajas y desventajas de cada método dependen de la facilidad de realización, reproducibilidad, equipamiento requerido y nivel de resolución. Las técnicas moleculares proveen más detalle e información consistente sobre las características específicas de cada cepa (Figura 1). Técnicas moleculares modernas basadas en la caracterización genotípica tienden a asociar bacterias con huéspedes específicos (Kapur y col., 1995; Zadoks y col., 2000).



Familia	Género	Especie	Subespecie	Cepa
Secuenciamiento de DNA				
Secuenciamiento rDNA 16S				
ARDRA				
Reasociación DNA-DNA				
IRNA-PCR				
RFLP PFGE				
Izoenzimas Multicolus				
AFLP				
RAPD's APPCR				
Rep-PCR				

Figura 1- Resolución relativa de diferentes técnicas basadas en el análisis molecular de DNA. ARDRA: análisis de restricción de rDNA amplificado; RFLP: análisis de polimorfismos de restricción; AFLP: amplificación de fragmentos polimórficos; RAPD's APPCR: PCR con cebadores arbitrarios; PFGE: electroforesis de campos pulsantes.

Especificidad de huésped

En la bibliografía se citan varios trabajos donde se describe una considerable heterogeneidad genética en las poblaciones naturales de *S. aureus* (Hájek y Marsálek, 1971; Devriese, 1984; Kapur y col., 1995). El concepto que las cepas de *S. aureus* aisladas de diferentes huéspedes difieren unas de otras fue apreciado por Madison y col. en 1935. Los análisis fenotípicos en cepas de *S. aureus* aisladas de huéspedes humanos y bovinos han revelado diferencias importantes entre las dos poblaciones de aislados. Diferentes técnicas han sido usadas en estudios epidemiológicos. Los resultados han arrojado diferencias en las cepas aisladas de cada especie. El entendimiento de estas diferencias asentadas en las bases genéticas de la variación entre las cepas de *S. aureus* no se conoce (Herron y col., 2002). Asimismo, la especificidad huésped - enfermedad - clones



bacterianos ha sido previamente descrita para una variedad de bacterias patógenas. Un ejemplo de especificidad de huésped se observa en los aislados de *Bordetella bronchiseptica*, cuyos clones están fuertemente asociados a infecciones en cerdos o perros (Selander y Musser, 1990). Kapur y col. (1995) en un estudio realizado sobre 200 cepas de *S. aureus* aisladas de humanos y de diferentes huéspedes animales determinó que las cepas tienen predominantemente un origen clonal y están preferentemente asociadas a un huésped determinado. Se informa especificidad de huésped en otros géneros como *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae* y *Listeria monocytogenes* (Jersey y col., 1999). En la bibliografía también se detalla que genes asociados a virulencia tienen una asociación huésped específica, Krieswirth y col. (1983) lo demostró al analizar el gen asociado al síndrome del shock tóxico (TSST-1) en cepas de *S. aureus* aisladas de huéspedes ovinos, el cual mostró ser diferente del gen aislado de cepas humanas.

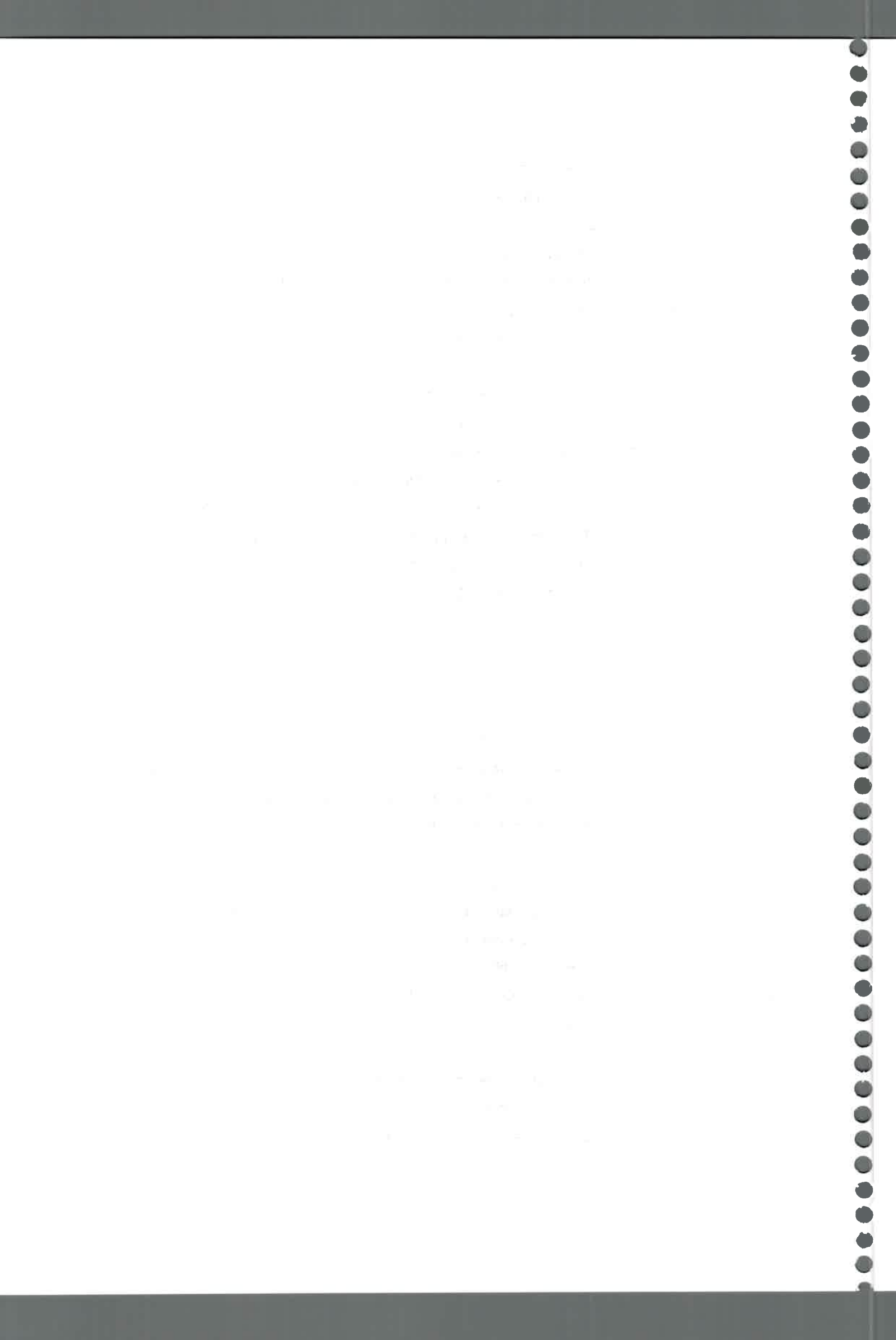
Recientemente se han descrito trabajos de estudios epidemiológicos de genes asociados a virulencia donde se informa que no todos los genes de virulencia o elementos regulatorios se encuentran en una población, sugiriendo que estos se hallan ubicados sobre elementos móviles, como islas patogénicas (Moore y Lindsay, 2001).

Marcadores moleculares

El análisis molecular de cepas de *S. aureus* ha comenzado hace relativamente pocos años a nivel internacional, las técnicas están siendo ampliamente usadas en cepas aisladas de origen humano, pero en nuestro país hay pocos estudios en cepas de origen bovino (Bogni y col., 1998; Buzzola y col., 2001; Reinoso y col., 2004).

La técnica de RAPD ha sido empleada por varios autores para el análisis de cepas causantes de patologías en humanos (Saulnier y col., 1993), pero se han determinado problemas de reproducibilidad interlaboratorio. La identificación rápida de cepas es importante para el diagnóstico y tratamiento de infecciones. La búsqueda de marcadores moleculares está orientada a esta identificación. Una alternativa para la identificación rápida podrían ser las sondas genéticas a partir de la obtención de marcadores moleculares por RAPD-PCR o REP-PCR (Caetano-Annoles y Gresshoff, 1998).

Los caracteres fenotípicos son producidos por el genotipo, el medio ambiente y la interacción genotipo medio. Los marcadores moleculares basados en la secuencia del DNA permiten una comparación clara y directa del material genético de dos o más organismos, evitando alguna influencia ambiental sobre la expresión génica.





La taxonomía numérica como teoría clasificatoria

Ante la diversidad que lo rodea, el hombre recurre a la clasificación como medio para evitar la confusión e, instintiva o conscientemente, clasifica su mundo circundante. La clasificación es el agrupamiento de objetos en clases sobre la base de atributos que poseen en común y/o sus relaciones.

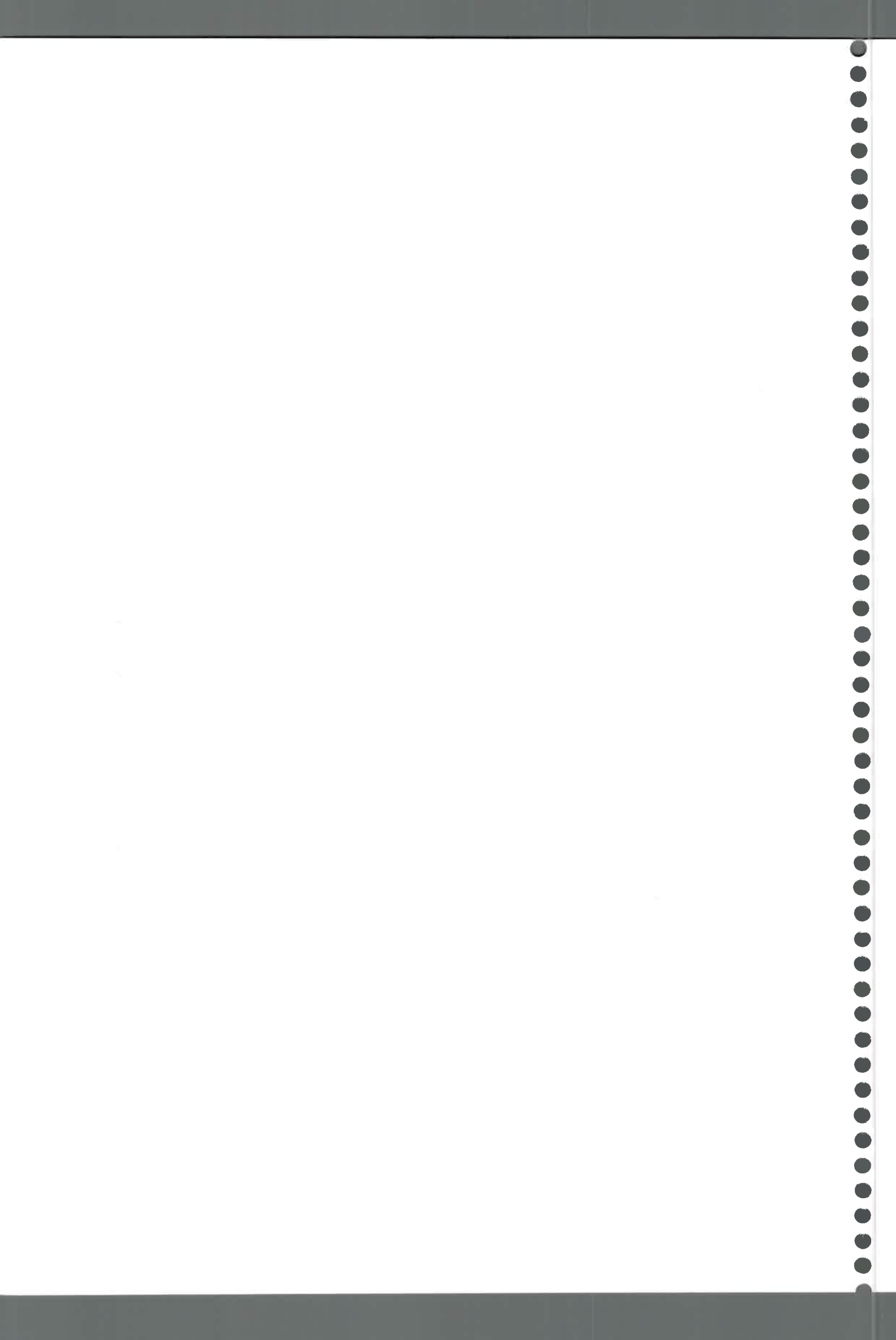
El origen de la ciencia de la clasificación se remonta hasta los antiguos griegos. No obstante, el proceso de clasificar, el reconocimiento de similitudes y el agrupamiento de organismos u objetos en función de esas similitudes, comienza con el hombre primitivo. En la diversidad que el hombre enfrenta está el mundo viviente y es en éste donde ha tenido lugar un monumental proceso clasificatorio sin paralelo en otras disciplinas. No es entonces casual que este proceso clasificatorio haya sido el contexto donde nació la "taxonomía numérica" (Crisci y Lopez Armengol, 1983).

La taxonomía es el estudio teórico de la clasificación, incluyendo sus bases, principios, procedimientos y reglas. El motivo de estudio de las clasificaciones son los objetos y organismos a clasificar. La taxonomía es la ciencia que trata de explicar cómo se clasifica y cómo se determina. Utiliza determinados grados de similitud entre organismos para establecer un taxón. Una sola característica no determina la posición taxonómica de un organismo, la similitud general y la definición de los taxones se basan en varias características.

Tres son los requisitos lógicos que debe cumplir un agrupamiento de objetos en clases para que sea considerado una clasificación:

- a) en cada clase de más de un objeto (no unitarias) debe existir, para cada objeto de la clase, otro distinto que comparta con él como mínimo un atributo.
- b) el ser miembro de una clase no es en sí mismo un atributo.
- c) cada objeto de cualquier clase debe diferir, al menos, en un atributo de cada objeto de cualquier otra clase.

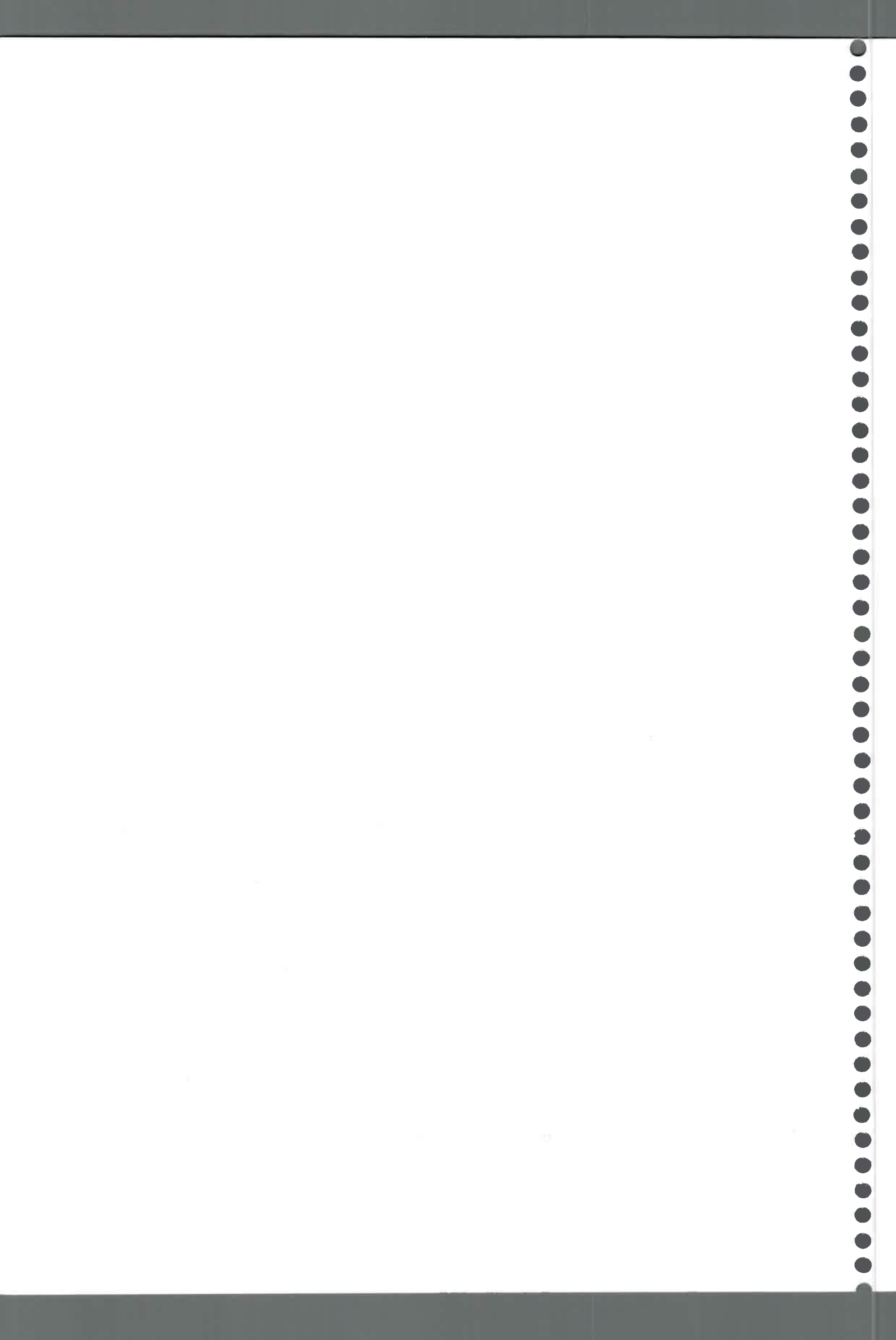
La aplicación de los conceptos de taxonomía numérica fue posible mediante el uso de computadoras, debido a la gran cantidad de cálculos a realizar.



Aplicación de las técnicas de la taxonomía numérica

Se entiende por técnicas numéricas la rama de la taxonomía numérica que, mediante operaciones matemáticas, calcula la afinidad entre unidades taxonómicas en base al estado de sus caracteres. La asociación de conceptos taxonómicos con variables numéricas ha dado como resultado una inmensa cantidad y variedad de técnicas numéricas. A pesar de esta diversidad, es posible hallar en casi todas ellas una serie de pasos comunes. Los pasos elementales comunes a casi todas las técnicas numéricas son los siguientes:

- Elección de las unidades. Se eligen los organismos a estudiar y se definen las unidades a clasificar denominadas "unidades taxonómicas" (OTU).
- Elección de los caracteres. Un carácter es definido como una propiedad que puede variar entre las OTUs. Se eligen los caracteres que describan a las OTUs y se registra el estado de los caracteres presentes en ellas. En los análisis realizados en este informe, los caracteres a analizar fueron las bandas de diferente peso molecular.
- Construcción de una matriz básica de datos. Con la información obtenida en los pasos anteriores se construye una matriz básica de datos (MBD) de OTUs por estados de los caracteres.
- Obtención de un coeficiente de similitud para cada par posible de OTU. El parecido o similitud es cuantificable aplicando un coeficiente de similitud. Con el uso de estos coeficientes en operaciones matemáticas pueden calcularse las similitudes (o su complemento: las diferencias) respecto a cada par posible de OTU de matriz básica de datos.
- Construcción de una matriz de similitud. Con los valores de similitud calculados en el paso anterior se construye una matriz de similitud OTU por OTU.
- Conformación de grupos. En base a la matriz de similitud del paso anterior y mediante la aplicación de distintas técnicas se obtiene la estructura taxonómica del grupo en estudio.
- Formulación de inferencias y generalizaciones acerca de los taxones.



Estructura taxonómica

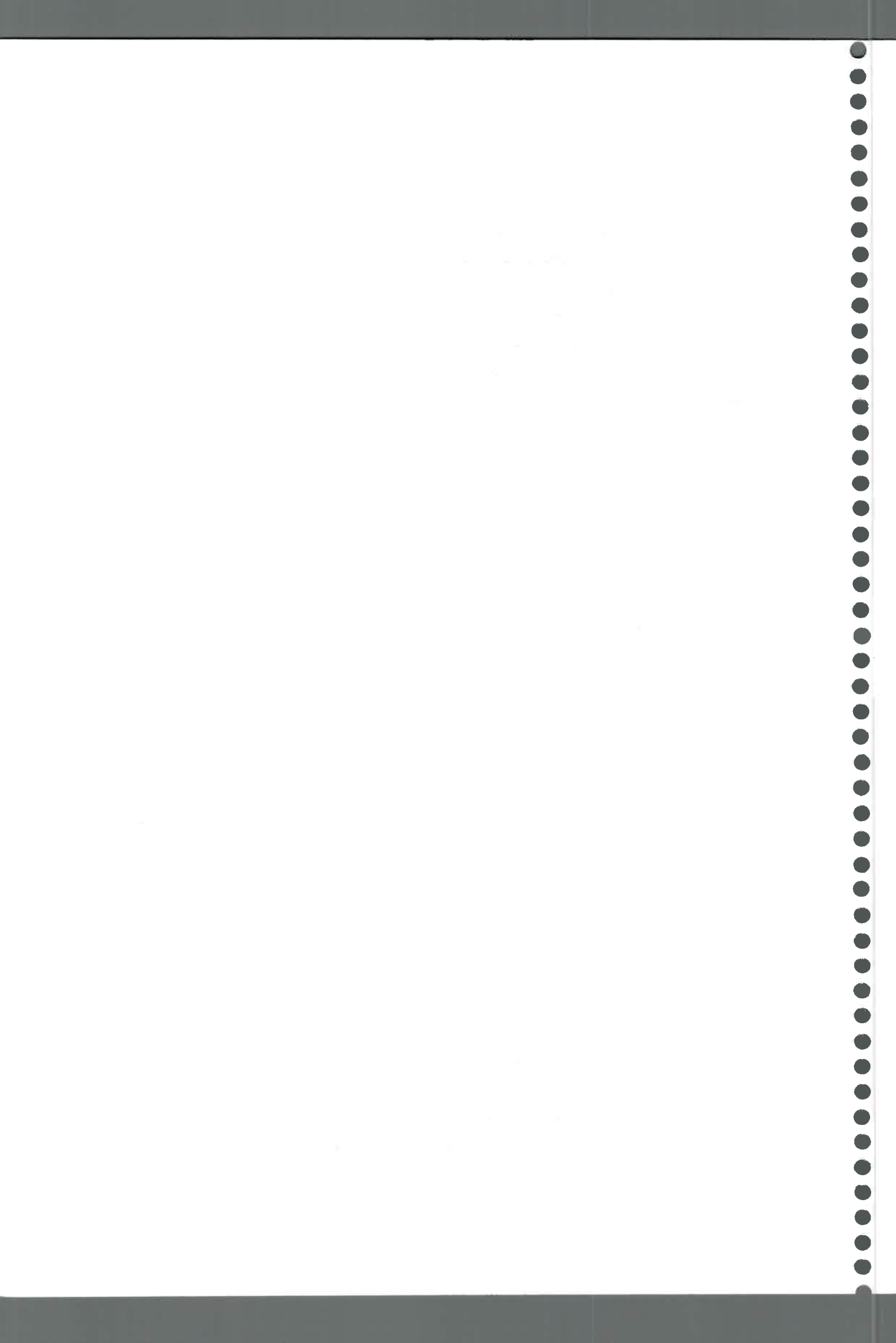
Una tabla de similitudes no representa por sí sola la estructura taxonómica de las OTUs. Las cepas serán ordenadas arbitrariamente y no representarán los grupos. Las similitudes requieren una mayor manipulación. Existen dos tipos principales de análisis que revelan la estructura taxonómica: "análisis de grupos" (cluster analysis) y la "ordenación" (ordination). El resultado del primer análisis, es un diagrama con forma de árbol denominado *dendrograma* (más precisamente fenograma, porque expresa relaciones fenéticas). En este diagrama los organismos se agrupan basándose en los índices de similitud. Los microorganismos con gran similitud quedan en proximidad geométrica. En el otro análisis se obtiene un diagrama de ordenación o un mapa taxonómico, en el cual se ubican junto a las OTUs similares.

En un análisis de grupos, el principio es buscar la tabla de similitudes para valores altos que indican los pares de OTUs similares. Se va formando un núcleo de grupos y mediante un programa computacional se busca el próximo valor de similitud más alto, luego se agrega la correspondiente OTU al grupo del núcleo. Finalmente todas las OTUs se fusionan en un grupo, representado por el dendrograma. En el dendrograma, las líneas dibujadas a niveles de similitud descendiente corresponden a una aproximación de subgrupos. Los coeficientes de correlación de agrupamiento más comunes son la media aritmética no ponderada (UPGMA) y el agrupamiento simple.

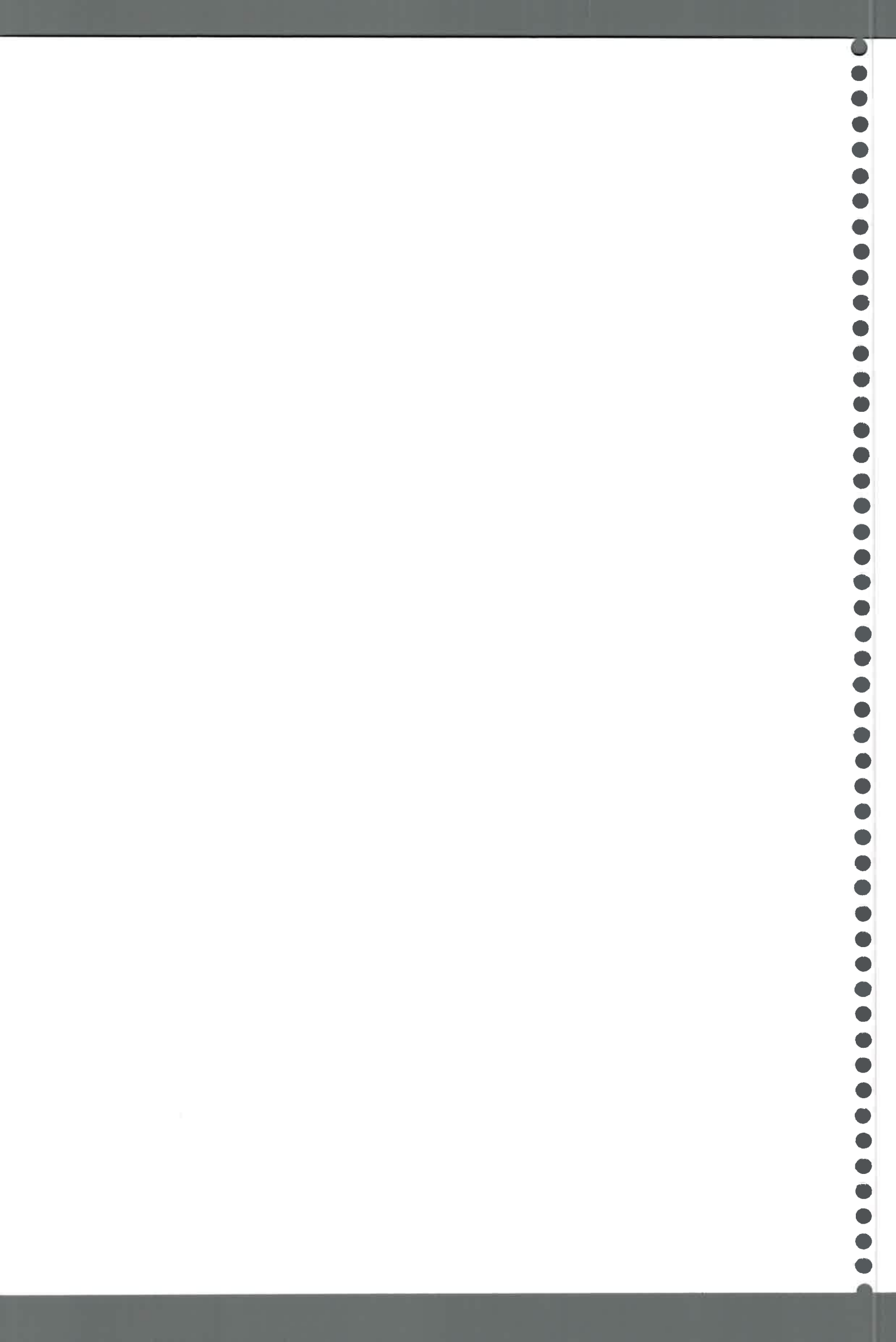
En la ordenación son analizadas las similitudes o los equivalentes matemáticos y el espacio es resumido en un espacio de dos o tres dimensiones, donde se pueden reconocer grupos a simple vista. Los métodos más comunes de ordenamiento son el "análisis de componentes principales" y el "análisis de coordenadas principales" (Chakraborty y Rao, 1991).

Para propósitos generales, un dendrograma es la representación más útil, aunque otras representaciones también son instructivas, ya que cada método enfatiza distintos aspectos de la taxonomía. Mediante la ordenación es posible analizar relaciones entre unidades taxonómicas en términos de distancia y espacio. Dichos métodos tienen un potencial informativo mayor que los dendrogramas en términos de relaciones.

El Programa NTSYS-pc puede ser usado para computar varias medidas de similitud y disimilitud entre pares de objetos y luego resumir la información en términos de agrupamiento de objetos similares (cluster analysis) ó en términos de un reordenamiento espacial mediante uno ó más ejes de coordenadas (Rohlf, 1993).



Objetivos



HIPÓTESIS

Las cepas de *S. aureus* aisladas de distintas fuentes (alimentos, leche cruda, humanos) tienen diferencias fenotípicas y genotípicas que permiten diferenciarlas de acuerdo a su origen. Estas diferencias podrían ser evidenciadas mediante el análisis de perfiles genéticos obtenidos por técnicas moleculares.

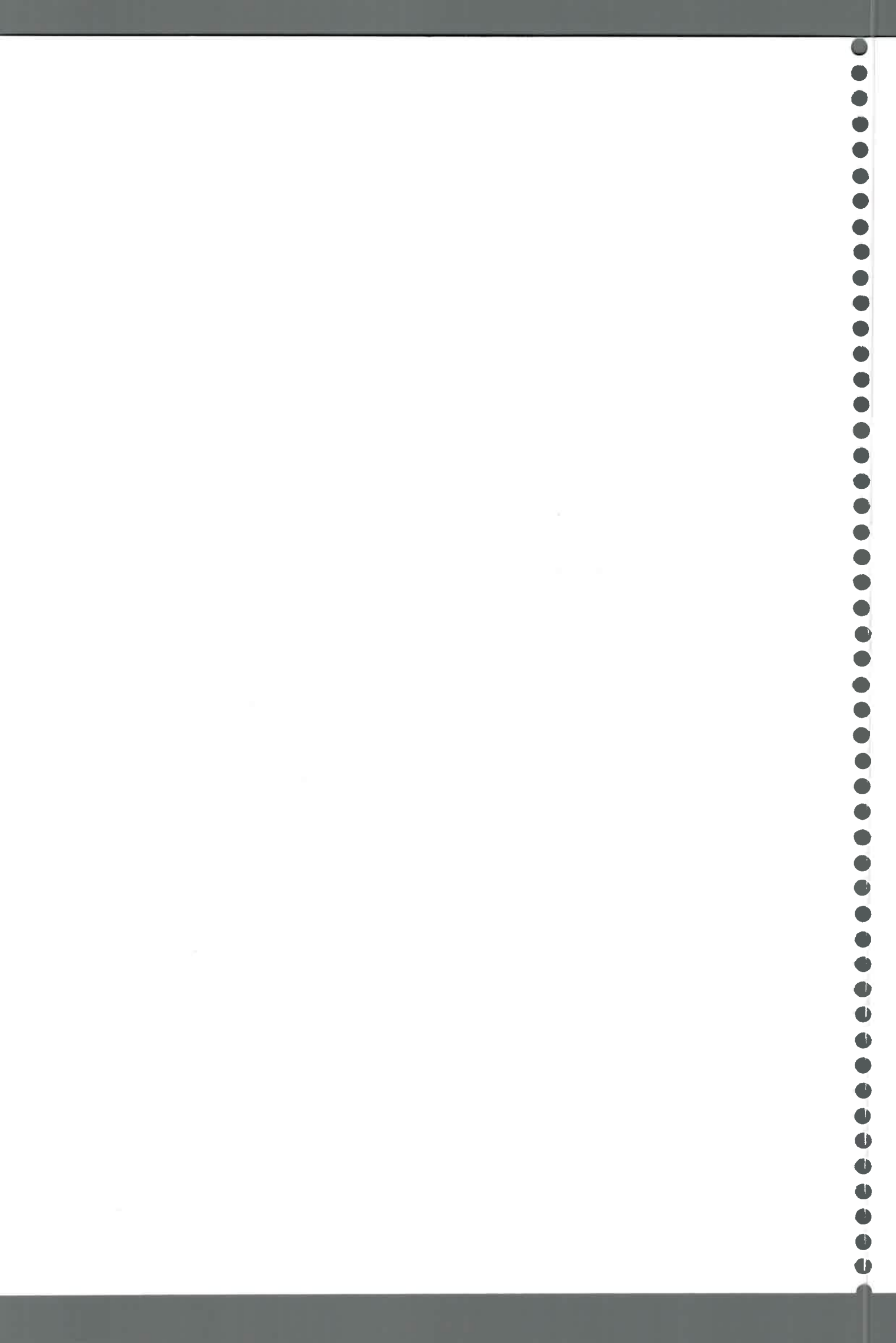
El análisis de los perfiles permitiría la obtención de marcadores moleculares, los cuales podrían ser usados para identificar cepas de *S. aureus* de distintos orígenes.

OBJETIVO GENERAL

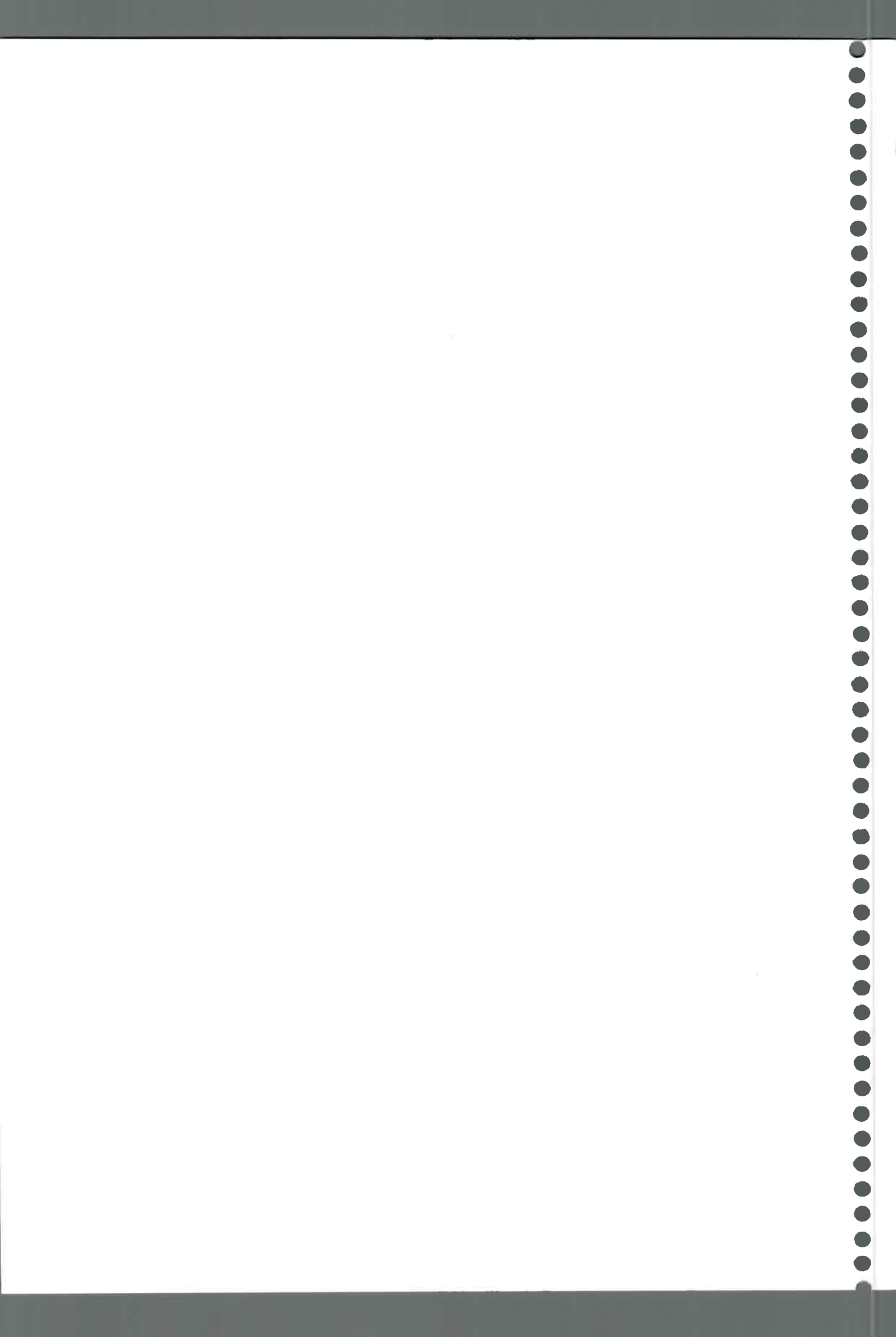
Realizar un estudio epidemiológico molecular en base a las relaciones genéticas de cepas de *S. aureus* aisladas de diferentes orígenes (alimentos, mastitis bovina, infecciones y flora normal de humanos) por RAPD-PCR y REP-PCR y su comparación con los resultados obtenidos por técnicas convencionales.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1- Aislar y caracterizar por métodos convencionales cepas de *S. aureus* de diferentes orígenes (alimentos, mastitis bovina, infecciones y flora normal de humanos).
- 2- Identificar genotipos de *S. aureus* mediante técnicas moleculares por RAPD-PCR y REP-PCR.
- 3- Comparar la eficacia de las técnicas moleculares frente a las técnicas convencionales.
- 4- Buscar marcadores moleculares.
- 5- Analizar la distribución y comparar los polimorfismos de genes asociados a virulencia (*spaA*, *coa*, *cap 5*, *cap 8*, *clfA*, *cna*, *sea*, *agr*, *hld*, *sae*) en cepas aisladas de diferentes orígenes.
- 6- Comparar genotípicamente, mediante taxonomía numérica, cepas de *S. aureus* aisladas de diferentes orígenes.



Materialles

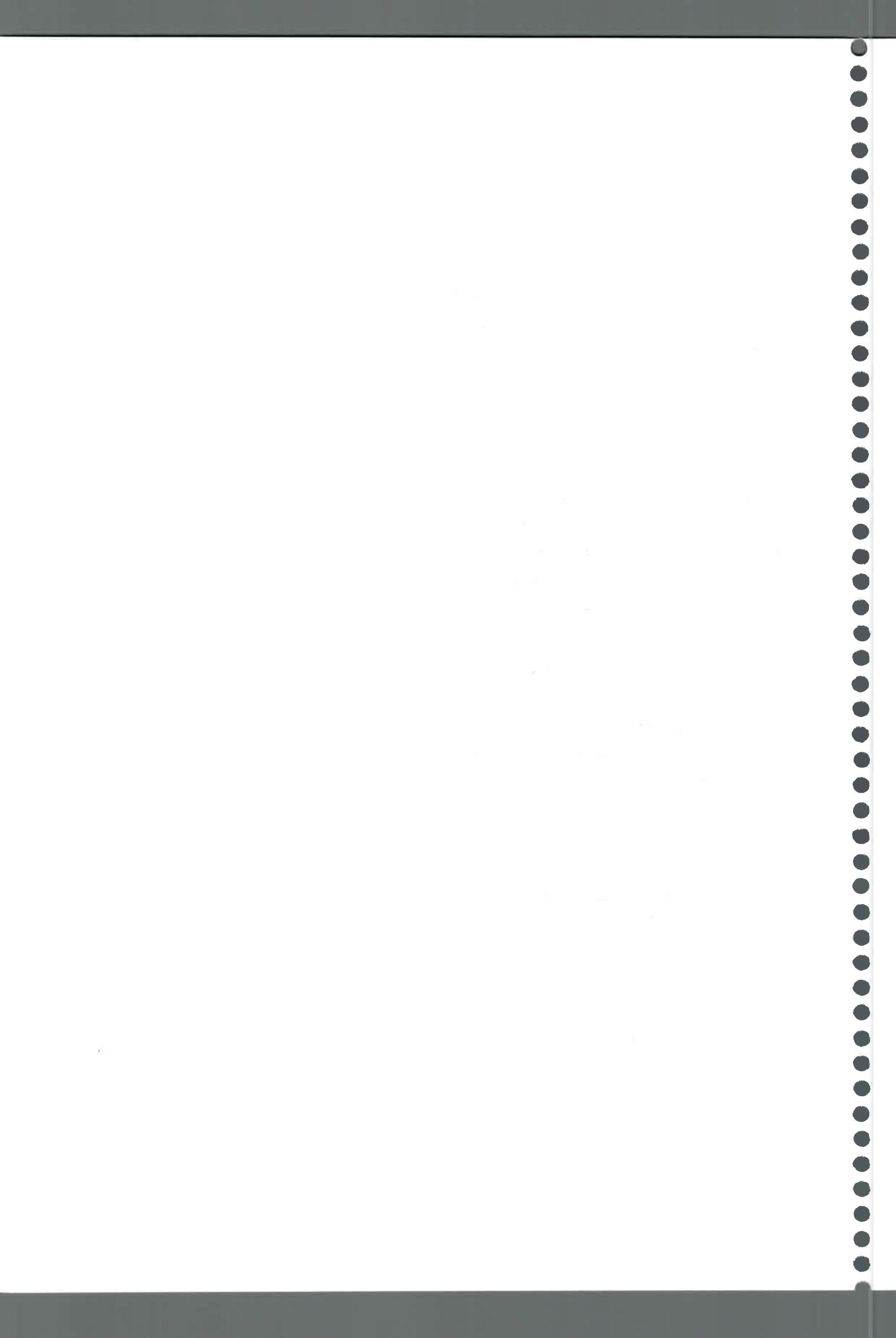


1) MEDIOS DE CULTIVO

- Agar tripticasa soya DIFCO (TSA).
- Infusión tripticasa soya DIFCO (TSB).
- Agar Mueller-Hinton (Britania).
- Agar sangre de carnero: TSA con el agregado de sangre de carnero al 0.7%.
- Agar sangre de conejo: TSA con el agregado de sangre de conejo al 0.7%.
- Medio Bair Parker (DIFCO).
- Medio OF-Glucosa: Peptona 2 gr, ClNa 5 gr., azul de bromotimol 1% 3ml, Agar 15 gr.

2) REACTIVOS Y SOLUCIONES

- Agarosa D1 - LE 100g (Promega).
- Agarosa de bajo punto de fusión (LMP).
- BL: EDTA 50 mM, Tris-ClH 20 mM.
- BR: EDTA 100 mM, Doc 0,2%, Sarkosyl 1%, Proteinasa K 20 mg/ml.
- Bromuro de etidio 10 mgr/ml.
- CTAB – ClNa: CTAB 5%, ClNa 0,5 M.
- EC: EDTA 10 mM, Tris-ClH 10 mM, DOC 0,2%, Sarkosyl 0,5 %, lisozima 1 mg/ml.
- Fenol-cloroformo.
- KIT Gelout-PCR (Promega).
- PBS: NaH_2PO_4 0,2 M, NaHPO 0,2 M, ClNa 3 M.
- Plasma bovino.
- RNAsa (stock 1mg/ml).
- SB: TrisClH 10 mM, ClNa 20 mM, EDTA 50 mM.
- STET: sacarosa al 8%, Tris HCl pH 8,5, 50 mM, EDTA 1 mM y Tritón X 100 al 0,1%.
- Solución fisiológica: ClNa 0,85%.
- Solución de lisis (SDS 4%, OHNa 0,4 N).
- Solución de lisostafina: 12 IU, ClNa 100 mM, Tris-OHNa 40 mM, EDTA 50 mM pH 6,9.
- Solución de Neutralización o Buffer B (3M de Ácido Acético-Acetato de sodio – pH 5,5).
- Suero de perro.
- TAE: 242 gr de Tris base, 57,1 ml de ácido acético glacial, 100 ml EDTA 0,5 M (1000 ml).
- TBE: 50 gr de Tris base, 27.5 gr de ácido bórico, 20 ml de EDTA 0.5 M (1000 ml).
- TE: Tris ClH pH 8,5, 10 mM y EDTA 1 mM pH 8.
- Tris ClH pH 7,5, 1 M.
- Tris ClH pH 8, 1 M.



3) ANTIBIOTICOS

- | | |
|----------------------------|--------------------------|
| -Penicilina (10 IU) | -Eritromicina (15 µg/ml) |
| -Oxacilina (6 µg/ml) | -Vancomicina (30 µg/ml) |
| -Novobiocina (30 µg/ml) | -Tetraciclina (30 µg/ml) |
| -Estreptomicina (10 µg/ml) | -Cefalotina (30 µg/ml) |
| -Kanamicina (30 µg/ml) | -Ampicilina (10 µg/ml) |
| -Espiramicina (40 µg/ml) | -Gentamicina (40 µg/ml) |

Todos los antibióticos fueron de Laboratorios Britania.

4) ENZIMAS

- *Sma I* (Promega)
- *EcoRI* (Promega)
- *Accl* (Promega)
- *Taq* ADN polimerasa (Promega, Pharmacia, Sigma)

5) CEPAS

Se aislaron 212 cepas de *S. aureus* de distintos orígenes (Tablas 1, 2 y 3). Las cepas aisladas de huésped humano y bovino corresponden a dos regiones diferentes, provincias de Buenos Aires y de Córdoba. De las 49 cepas provenientes de episodios clínicos, 25 se obtuvieron de nosocomios de la ciudad de Río Cuarto y las restantes 24 cepas de nosocomios de la ciudad de Buenos Aires. Cincuenta y tres cepas aisladas de bovinos provenían de cuatro tambos de la región de Córdoba (nombrados de A a D) y 46 de 19 tambos de la región de Córdoba (nombrados de A a S). La región de Córdoba se indica como región I y la región de Buenos Aires como región II. En la tabla 4 se indican los números de cepas aisladas de cada tambo. Todas las cepas bovinas se obtuvieron de vacas con mastitis subclínica. La Tabla 5 muestra las cepas empleadas, su origen y el número asignado.

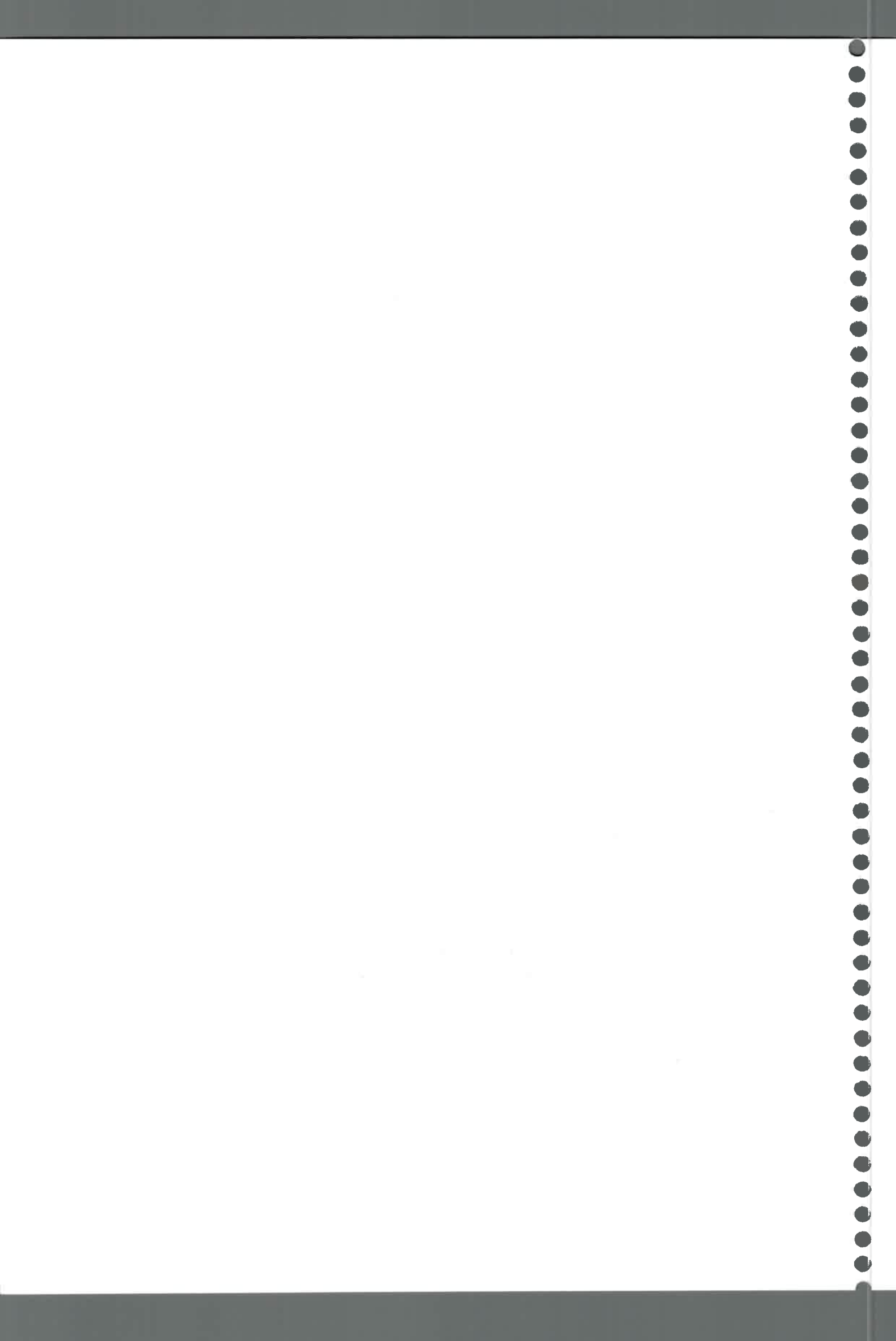


Tabla 1: Cepas de *S. aureus* aisladas de distintos orígenes.

HUESPED	ORIGEN	NUMERO DE CEPAS
	EPISODIOS CLINICOS	
HUMANO		49
	PORTADORES	21
	MASTITIS	
BOVINO	SUBCLINICA	99
ALIMENTOS	ALIMENTOS	35
	CONTAMINACION	8
TOTAL		212

Tabla 2: Origen de las cepas de *S. aureus* aisladas de infecciones clínicas.

ORIGEN	NÚMERO DE CEPAS
Material respiratorio	5
Piel	10
Osteomielitis	3
Herida quirúrgica	9
Hemocultivo	10
Secreción ocular	2
Catéter	7
Orina	3

Tabla 3: Origen de las cepas de *S. aureus* aisladas de alimentos.

ORIGEN	NÚMERO DE CEPAS
Fideos	4
Helados	27
Crema	2
Chorizo	1
Mouse	1

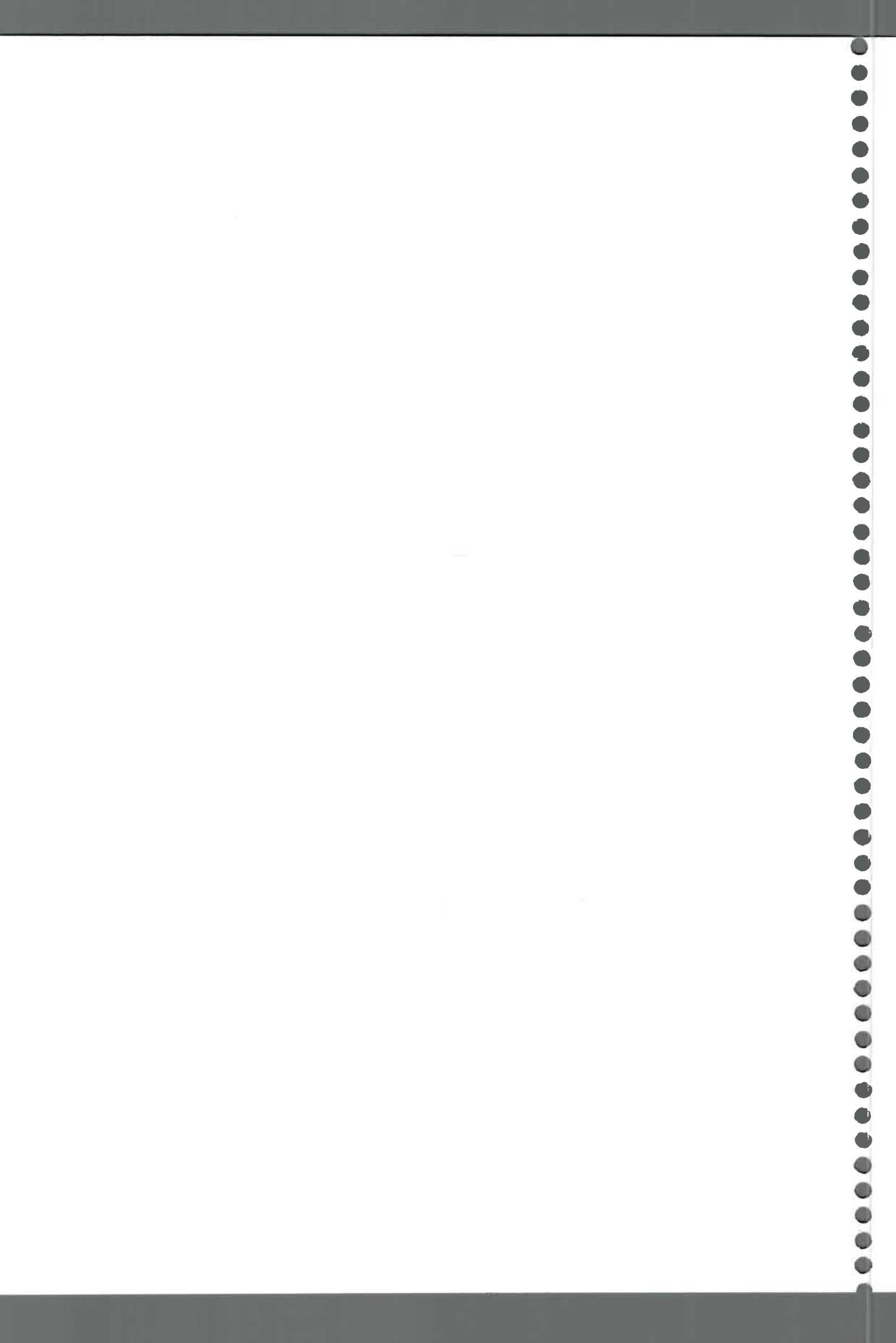


Tabla 4: Número de cepas aisladas de bovinos en cada tambo.

REGION		TAMBO	NUMERO DE CEPAS
I	CORDOBA	A	15
		B	5
		C	8
		D	24
II	BUENOS AIRES	A	6
		B	3
		C	2
		D	2
		E	7
		F	2
		G	3
		H	2
		I	2
		J	2
		K	2
		L	2
		M	2
		N	2
		O	1
		P	1
Q	2		
R	1		
S	3		
TOTAL			99

Además, se aislaron 8 cepas asociadas a la contaminación de alimentos, que correspondieron a: 3 aislados de nariz, 1 de una persona manipuladora del alimento, 1 de manos de un operario, 1 de superficie de una mesada, 1 de una pileta y 1 de un molde.

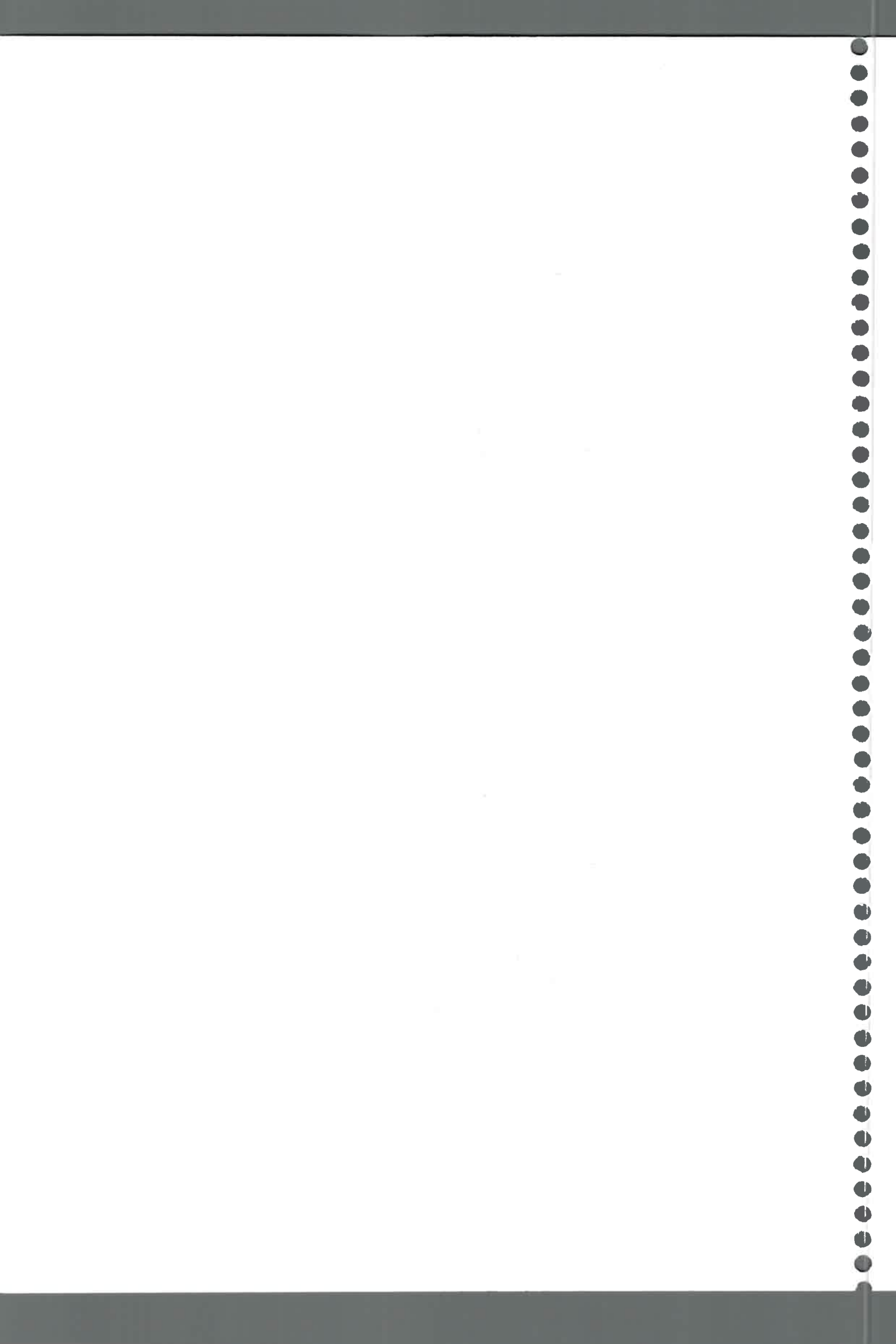
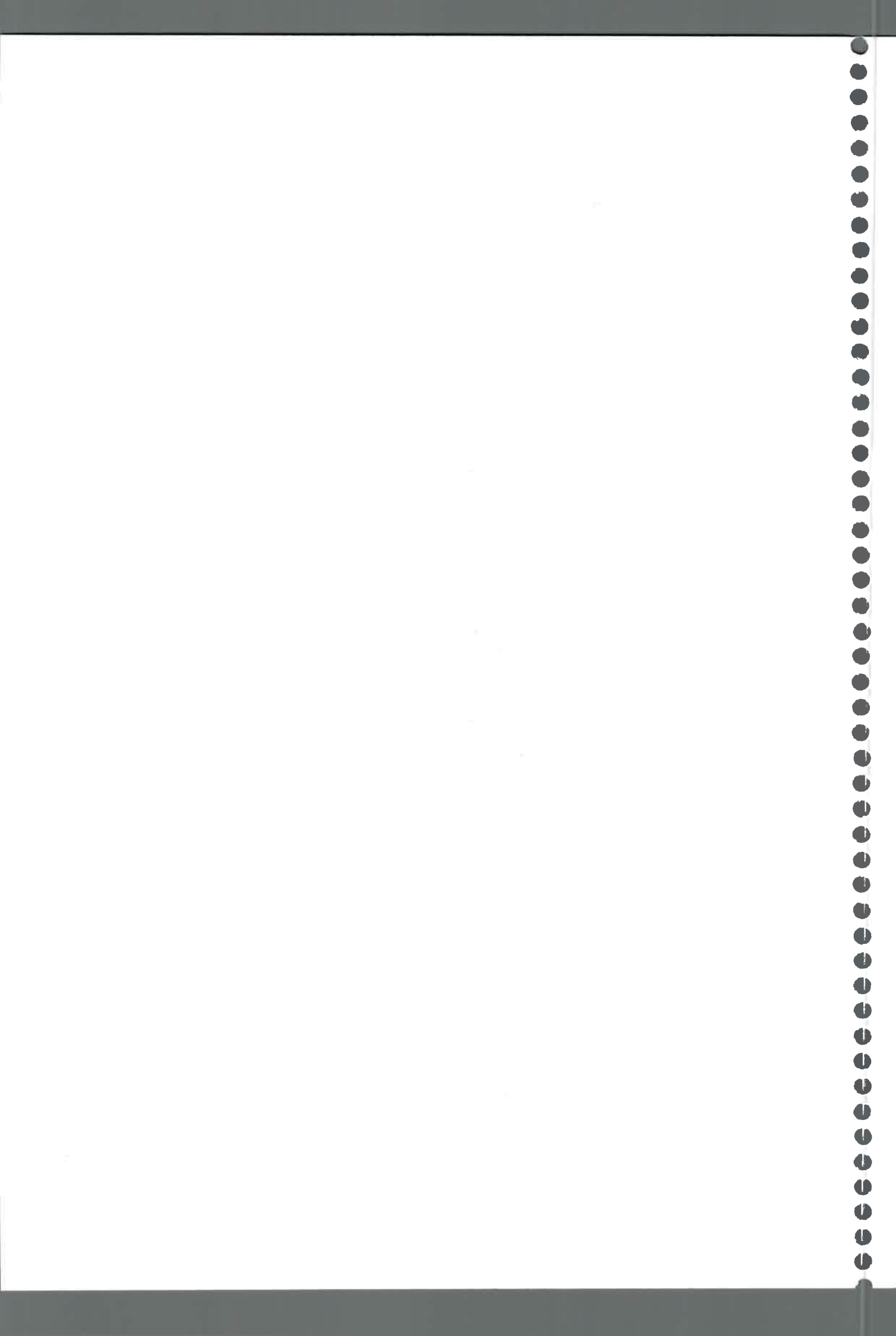
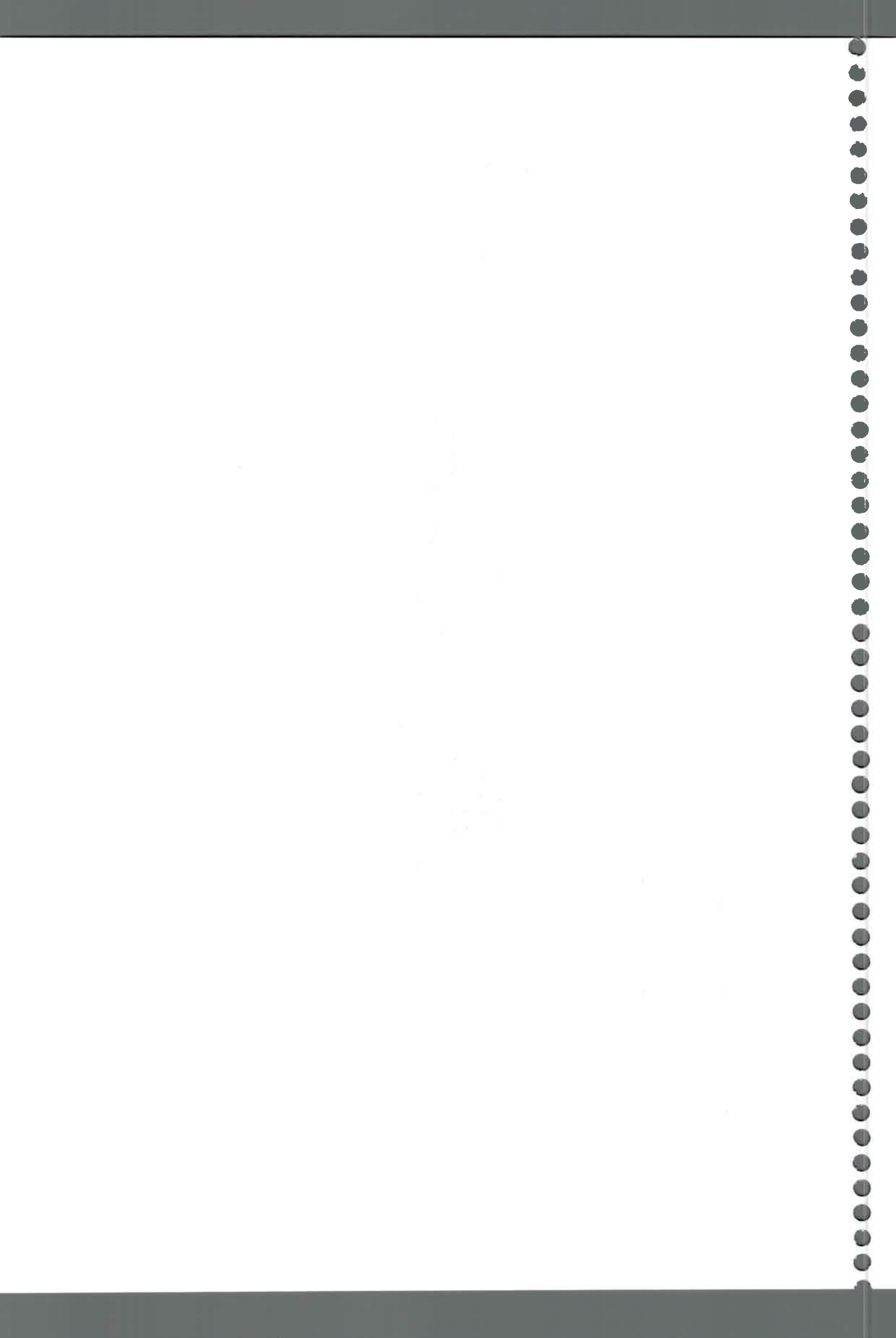


Tabla 5: Cepas de *S. aureus* empleadas en el presente trabajo

CEPA	ORIGEN	SITIO DE AISLAMIENTO	LUGAR
201	Humano	Portador nasal	Río Cuarto
203	Humano	Portador nasal	Río Cuarto
215	Humano	Portador nasal	Río Cuarto
216	Humano	Portador nasal	Río Cuarto
211	Humano	Portador nasal	Río Cuarto
239	Humano	Portador nasal	Río Cuarto
240	Humano	Portador nasal	Río Cuarto
242	Humano	Portador nasal	Río Cuarto
243	Humano	Pabellón auricular	Río Cuarto
246	Humano	Portador nasal	Río Cuarto
274	Humano	Portador nasal	Río Cuarto
293	Humano	Portador nasal	Río Cuarto
238	Humano	Portador nasal	Río Cuarto
290	Humano	Portador nasal	Río Cuarto
245	Humano	Portador nasal	Río Cuarto
220	Humano	Portador nasal	Río Cuarto
223	Humano	Portador nasal	Río Cuarto
228	Humano	Portador nasal	Río Cuarto
251	Humano	Portador nasal	Río Cuarto
253	Humano	Manos	Río Cuarto
256	Humano	Portador nasal	Río Cuarto
510	Humano	Infección respiratoria	Río Cuarto
511	Humano	Infección en piel	Río Cuarto
512	Humano	Osteomielitis	Río Cuarto
513	Humano	Infección en piel	Río Cuarto
515	Humano	Herida quirúrgica	Río Cuarto
516	Humano	Osteomielitis	Río Cuarto
517	Humano	Herida quirúrgica	Río Cuarto
519	Humano	Hemocultivo	Río Cuarto
520	Humano	Hemocultivo	Río Cuarto
521	Humano	Infección respiratoria	Río Cuarto
522	Humano	Infección respiratoria	Río Cuarto
523	Humano	Secreción ocular	Río Cuarto
524	Humano	Catéter	Buenos Aires
525	Humano	Hemocultivo	Buenos Aires
526	Humano	Hemocultivo	Buenos Aires
5261	Humano	Hemocultivo	Buenos Aires
527	Humano	Hemocultivo	Buenos Aires
5271	Humano	Infección en piel	Buenos Aires
528	Humano	Herida quirúrgica	Buenos Aires
529	Humano	Catéter	Buenos Aires
530	Humano	Herida quirúrgica	Buenos Aires
531	Humano	Hemocultivo	Buenos Aires
532	Humano	Hemocultivo	Buenos Aires
5322	Humano	Bacteremia	Buenos Aires
533	Humano	Secreción ocular	Buenos Aires
534	Humano	Catéter	Buenos Aires
535	Humano	Herida quirúrgica	Buenos Aires
536	Humano	Herida quirúrgica	Buenos Aires
537	Humano	Infección en piel	Buenos Aires
538	Humano	Infección en piel	Buenos Aires
539	Humano	Infección respiratoria	Buenos Aires
540	Humano	Hemocultivo	Buenos Aires



CEPA	ORIGEN	SITIO DE AISLAMIENTO	LUGAR
541	Humano	Catéter	Buenos Aires
542	Humano	Herida quirúrgica	Buenos Aires
543	Humano	Hemocultivo	Buenos Aires
544	Humano	Catéter	Buenos Aires
545	Humano	Infección urinaria	Río Cuarto
546	Humano	Infección urinaria	Río Cuarto
547	Humano	Infección respiratoria	Río Cuarto
548	Humano	Infección en piel	Río Cuarto
549	Humano	Infección en piel	Río Cuarto
550	Humano	Infección en piel	Río Cuarto
551	Humano	Catéter	Río Cuarto
552	Humano	Infección urinaria	Río Cuarto
553	Humano	Infección en piel	Río Cuarto
554	Humano	Osteomielitis	Río Cuarto
555	Humano	Infección en piel	Río Cuarto
556	Humano	Herida quirúrgica	Río Cuarto
557	Humano	Catéter	Buenos Aires
601	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
602	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
603	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
604	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
605	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
606	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
607	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
608	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
609	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
610	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
611	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
612	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
613	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
614	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
615	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
616	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
617	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
618	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
619	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
620	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
621	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
622	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
623	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
624	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
625	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
626	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
628	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
632	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
633	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
634	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
635	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
636	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
637	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
638	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
639	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
640	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
660	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
661	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba



CEPA	ORIGEN	SITIO DE AISLAMIENTO	LUGAR
662	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
663	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
664	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
665	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
666	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
667	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
668	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
670	Bovino	Cuarto mamario	Córdoba
671	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
672	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
673	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
674	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
675	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
676	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
677	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
678	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
679	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
680	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
681	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
682	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
683	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
684	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
685	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
686	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
687	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
688	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
689	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
690	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
691	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
692	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
693	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
694	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
695	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
696	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
697	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
698	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
699	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
700	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
701	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
702	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
703	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
704	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
705	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
706	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
707	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
708	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
709	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
710	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
711	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
712	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
713	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
714	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
715	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
716	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
717	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires

CEPA	ORIGEN	SITIO DE AISLAMIENTO	LUGAR
718	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
719	Bovino	Cuarto mamario	Buenos Aires
F1	Alimento	Fideos	Río Cuarto
F3	Alimento	Fideos	Río Cuarto
F5	Alimento	Fideos	Río Cuarto
F2	Alimento	Fideos	Río Cuarto
A11	Alimento	Helado	Río Cuarto
A13	Alimento	Helado	Río Cuarto
A14	Alimento	Helado	Río Cuarto
A15	Alimento	Helado	Río Cuarto
A16	Alimento	Helado	Río Cuarto
A17	Alimento	Helado	Río Cuarto
A18	Alimento	Helado	Río Cuarto
A19	Alimento	Helado	Río Cuarto
A110	Alimento	Helado	Río Cuarto
A111	Alimento	Helado	Río Cuarto
A112	Alimento	Helado	Río Cuarto
A113	Alimento	Helado	Río Cuarto
A114	Alimento	Helado	Río Cuarto
A115	Alimento	Helado	Río Cuarto
A116	Alimento	Helado	Río Cuarto
A117	Alimento	Helado	Río Cuarto
A118	Alimento	Helado	Río Cuarto
A119	Alimento	Helado	Río Cuarto
A120	Alimento	Helado	Río Cuarto
A121	Alimento	Helado	Río Cuarto
A122	Alimento	Helado	Río Cuarto
A123	Alimento	Helado	Río Cuarto
A124	Alimento	Helado	Río Cuarto
A125	Alimento	Helado	Río Cuarto
A126	Alimento	Helado	Río Cuarto
A127	Alimento	Helado	Río Cuarto
A129	Alimento	Helado	Río Cuarto
A128	Alimento	Crema	Río Cuarto
B1	Alimento	Crema	Río Cuarto
CH1	Alimento	Chorizo	Río Cuarto
M1	Alimento	Mouse	Río Cuarto
2N1	Contaminación de alimentos	Nariz de manipulador	Río Cuarto
2N2	Contaminación de alimentos	Nariz de manipulador	Río Cuarto
M2A	Contaminación	Manos manipulador	Río Cuarto
M01	Contaminación de alimentos	Manos manipulador	Río Cuarto
SM1	Contaminación de alimentos	Superficie mesada	Río Cuarto
PO1	Contaminación de alimentos	Pileta de cocina	Río Cuarto
MC1	Contaminación de alimentos	Molde de torta	Río Cuarto
M13	Contaminación de alimentos	Manos de manipulador	Río Cuarto

6) CEPAS CONTROLES

- *S. aureus* RN4220, RN6390, ISP479, *S. aureus* pRC9, *S. aureus* RC105 (pEntD): Cepa con plásmido portador del gen de la enterotoxina D. Peso molecular 27 kb.

7) CONDICIONES DE CULTIVO

Las cepas de *S. aureus* se cultivaron en TSB a 37° C con o sin agitación según el ensayo a realizar, durante 18-24 hs.

8) CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS

Un volumen de 0.8 ml de cultivos en fase exponencial fueron homogeneizados con 0.2 ml de glicerol estéril y conservado a -20° C. Para su utilización se suspendió un volumen de 10-40 µl del congelado en 1 ml de TSB.

9) LIOFILIZACIÓN DE LAS CEPAS

Cultivos de *S. aureus* crecidos toda la noche a 37° C en caldo TSB fueron centrifugados y resuspendidos en solución de liofilización (1% de sacarosa y 0.5% de peptona de caseína). Posteriormente las cepas fueron conservadas a -20° C durante 30 min. y luego liofilizadas.

10) CONSERVACIÓN DEL ADN

Los ADN extraídos fueron resuspendidos en 30 µl de TE y conservados a -20°C.

11) CEBADORES

Los cebadores empleados en las amplificaciones por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se muestran en la Tabla 6.

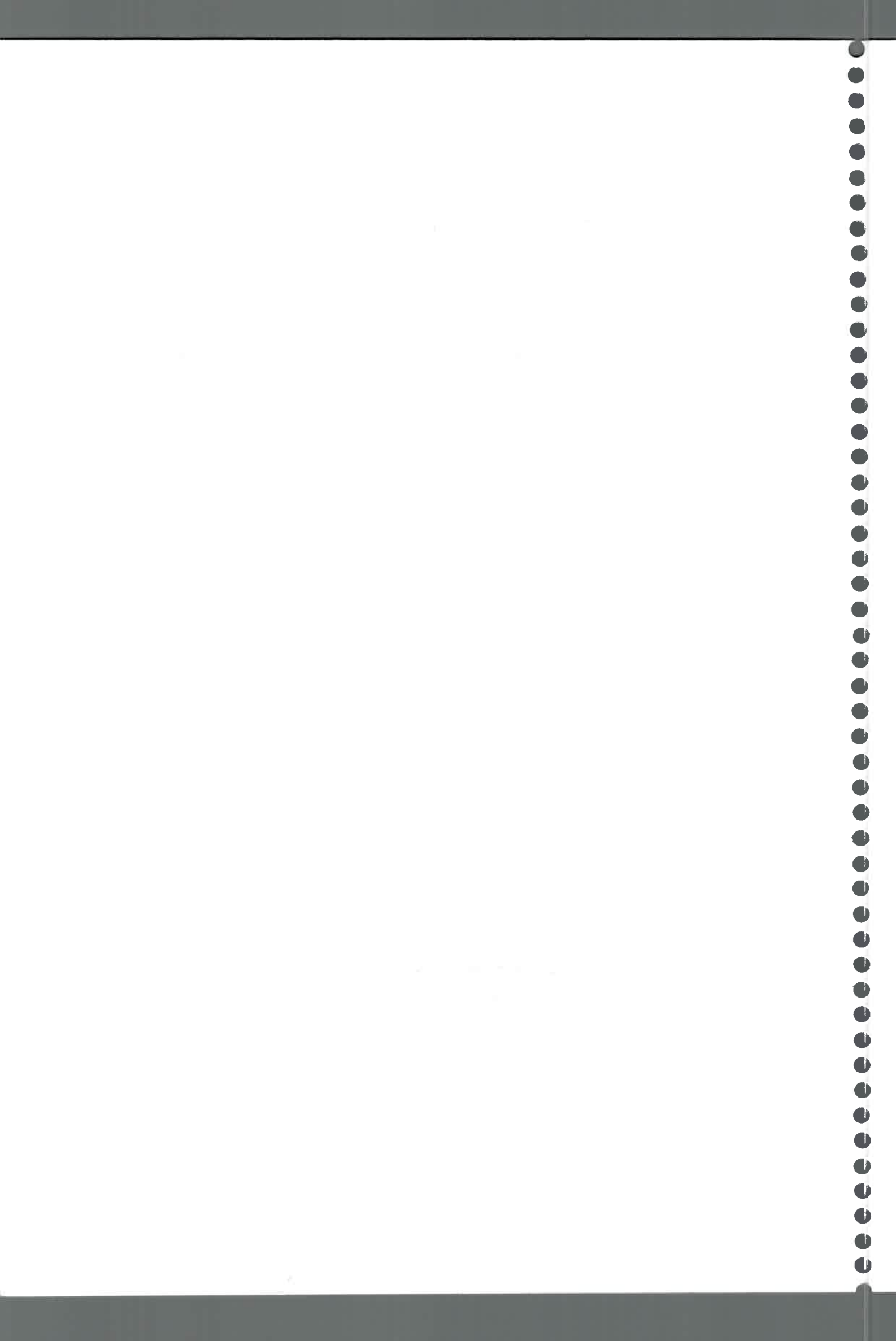
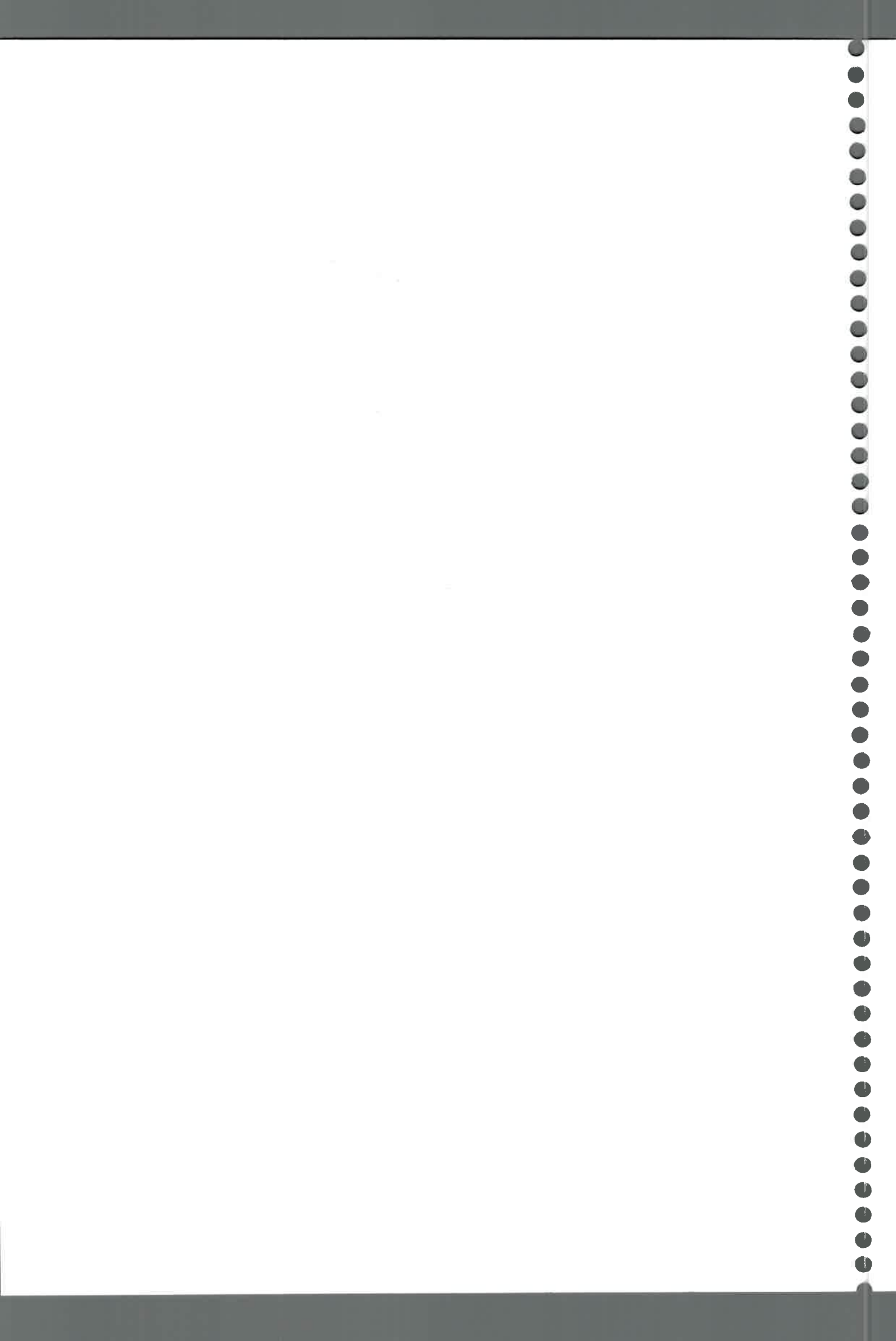


Tabla 6: Programas de PCR empleados en los distintos ensayos de amplificación

Programa nº	Programa PCR empleado	Gen ensayado
1	94°C 5 min.; (93°C 1 min., 37° C 1:30 min., 72°C 1:30 min.) x 40; 72° C 8 min.	RAPD
2	94° C 5 min., (93° C 1 min., 54° C 1:30 min., 72° C 1:30 min.) x 36; 72° C. 8 min.	REP
3	94° C 5 min., (94° C 1 min., 58° C 1 min., 72° C 1 min.) x 30; 72° C. 5 min.	<i>Spa IgG binding</i>
4	94° C 4 min., (94° C 1 min., 60° C 1 min., 72° C 1 min.) x 30; 72° C. 5 min.	<i>Spa X</i>
5	94° C 4 min., (94° C 1 min., 60° C 1 min., 72° C 1 min.) x 30; 72° C. 5 min.	<i>spaA</i>
6	94° C 4 min., (94° C 1 min., 58° C 1 min., 72° C 1 min.) x 30; 72° C. 5 min.	<i>coa</i>
7	94° C 4 min., (94° C 1 min., 57° C 1 min., 72° C 1 min.) x 35; 72° C. 5 min.	<i>clfA</i>
8	94° C 4 min., (94° C 30 seg., 50° C 30 seg., 72° C 1 min.) x 30; 72° C. 5 min.	<i>cna</i> dominio A
9	94° C 5 min., (94° C 1 min., 50° C 1 min., 72° C 1 min.) x 30; 72° C. 5 min.	<i>cna</i> dominio B
10	94° C 2 min., (94° C 15 seg., 57° C 15 seg., 72° C 30 seg.) x 20; 72° C. 2 min.	<i>cap 5</i>
11	94° C 2 min., (94° C 15 seg., 52° C 15 seg., 72° C 30 seg.) x 20; 72° C. 2 min.	<i>cap 8</i>
12	94° C 4 min., (94° C 2 min., 55° C 2 min., 72° C 1 min.) x 30; 72° C. 5 min.	<i>sea</i>
13	94° C 3 min., (94° C 1 min., 53° C 1 min., 72° C 1 min.) x 30; 72° C. 5 min.	<i>agr 1- agr 2</i>
14	94° C 3 min., (94° C 1 min., 55° C 1 min., 72° C 1 min.) x 30; 72° C. 5 min.	<i>agr 3</i>
15	93° C. 1 min.; (93° C 1min., 59° C 1min., 72° C 1:30 min.) x 30 ; 72°C 10 min.	<i>hld</i>
16	93° C 2 min.; (93° C 1min, 55° C 1min, 72° C 1:30 min.) x 29; 72° C 10 min.	<i>sae-cbs</i>
17	93° 1 min. 30 seg. (93° 1 min., 62° C 30 seg., 72° 1 min.) x 29; 72° 10 min.	<i>sae RS</i>
18	94° C 4 min., (94° C 1 min., 60° C 1 min., 72° C 1:30 min.) x 30; 72° C. 5 min.	<i>MRSA</i>



12) ABREVIACIONES

H: Ecotipo humano

B: Ecotipo bovino

NE1 a 5: Biotipos no específicos

M.R.: Material respiratorio

H.Q.: Herida quirúrgica

Ost.: Osteomielitis

S.O.: Secreción ocular

Pn: Penicilina

Oxa: Oxacilina

Tc: Tetraciclina

Sm: Estreptomina

Km: Kanamicina

Sp: Espiramicina

HS: cepas aisladas de huéspedes humanos sanos

Al: cepas aisladas de alimentos

MM: manos manipulador

NM: nariz manipulador

S: Superficie

BA: Buenos Aires

RC: Río Cuarto

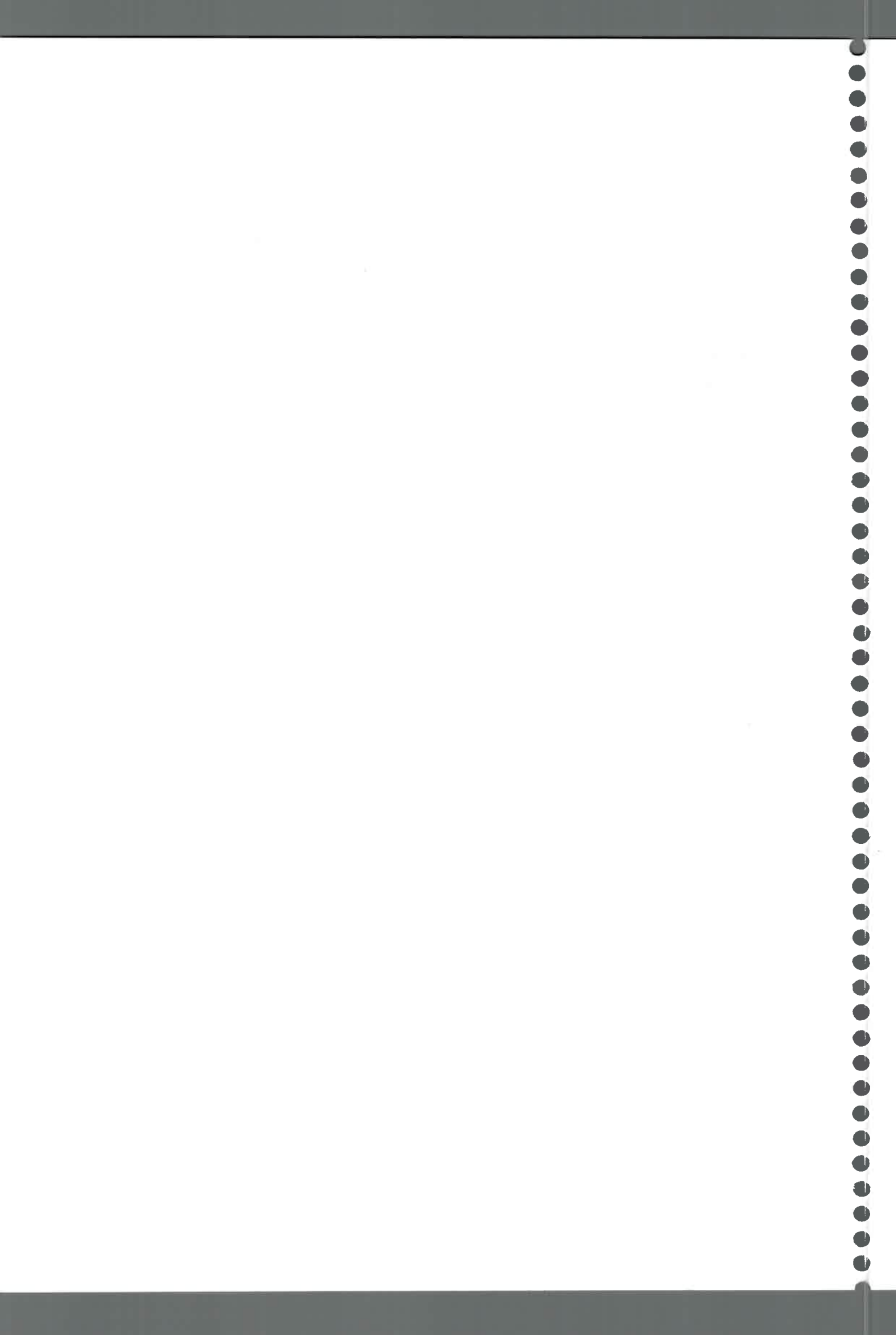
Er: Eritromicina

Vn: Vancomicina

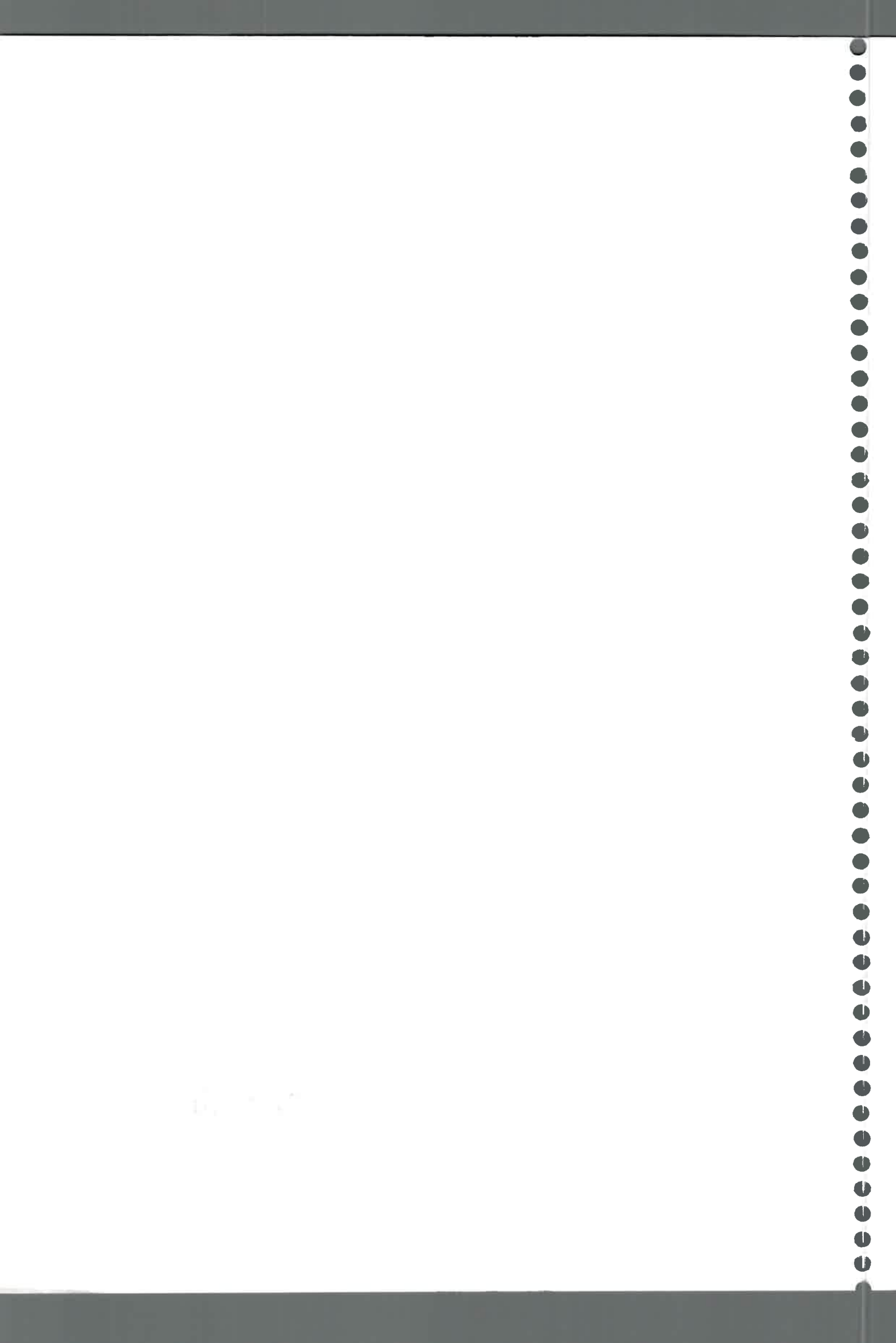
Gn: Gentamicina

Cf: Cefalotina

Amp: Ampicilina



Métodos



1 - AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*

a) Aislamiento de cepas del género *Staphylococcus*

Se aislaron 212 cepas de diferentes orígenes pertenecientes al género *Staphylococcus* que fueron bioquímicamente identificadas como *S. aureus*. El número de cepas aisladas se muestra en la Tabla 6 en la sección de Materiales.

a-1) Episodios clínicos: las cepas fueron aisladas en los nosocomios en agar sangre de carnero.

a-2) Portadores: se aislaron cepas de portadores mediante hisopados nasales y de manos. Las mismas fueron sembradas en agar TSA con el agregado de CINA al 6,5%.

a-3) Bovinos: se recogieron aproximadamente 5 ml de leche en tubos estériles, previa desinfección de los pezones. Las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su procesamiento, como fue descrito previamente.

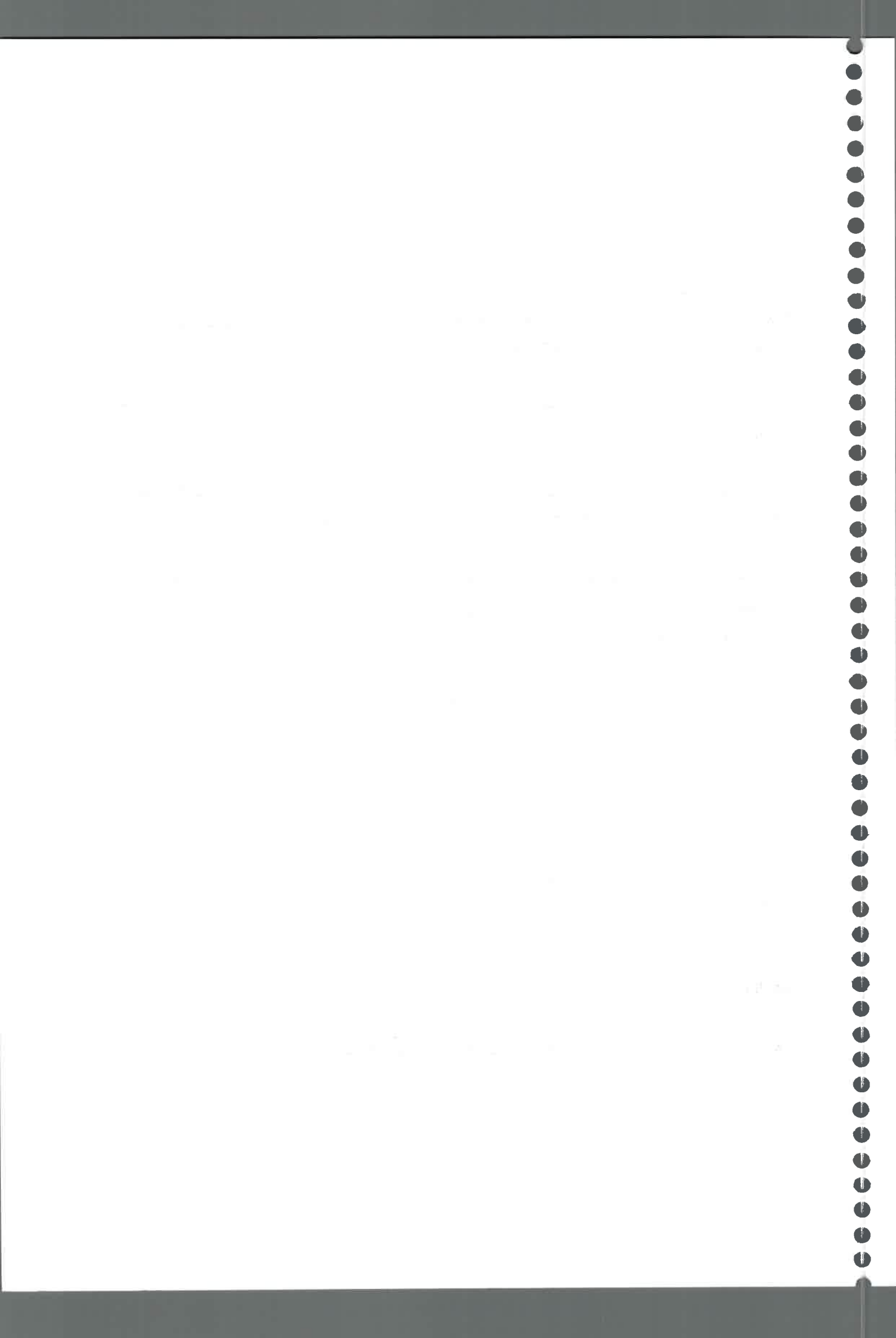
a-4) Alimentos: se procesaron muestras enriquecidas en medio Bair Parker y no enriquecidas en TSB.

b) Identificación mediante pruebas bioquímicas

Se realizó la identificación presuntiva de los estafilococos en base a la morfología colonial, patrón hemolítico, producción de pigmento, coloración de Gram y prueba de coagulasa. La identificación taxonómica se llevó a cabo según Bergey (Bair-Parker, 1974).

Se determinó:

- **Morfología colonial:** se determinó las características de las colonias y pigmentación.



-**Prueba de catalasa:** sobre un portaobjetos se suspendió 1 µl del cultivo de cada cepa crecido en TSB y se le agregó una gota de agua oxigenada. La formación de burbujas indicó reacción positiva.

- **Coagulasa:** 0,3 ml de un cultivo de cada cepa, crecido a 37° C durante toda la noche fue mezclado con 0.3 ml de plasma de conejo. La reacción de coagulación se determinó a las 4 hs

-**Crecimiento a 45° C:** se sembraron las cepas en caldos TSB a 45° C durante 48 hs

- **Utilización de maltosa:** se sembraron las cepas en placas de Petri conteniendo Medio OF con el agregado de 1% de maltosa. La reacción fue visualizada a las 24 horas. El viraje del indicador al color amarillo indicó reacción positiva.

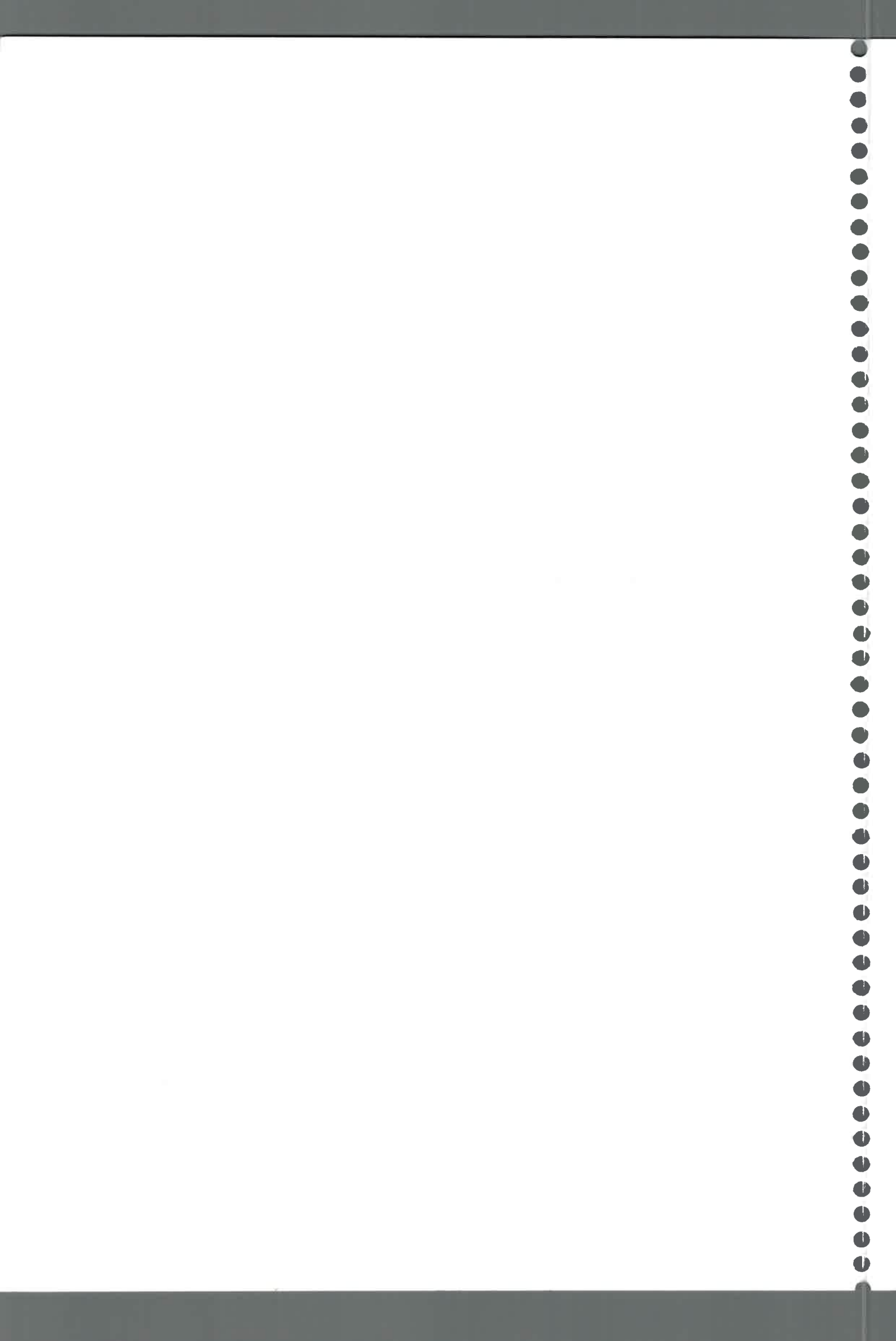
-**Prueba de Voges-Proskauer:** Se agregó 0,6 ml de alfa-naftol y 0,2 ml de OHK al 40% a 2 ml de cultivos crecidos a 37° C toda la noche en caldo TSB. Los tubos fueron incubados a 37° C y la reacción se reveló a los 15 minutos.

Como control de las pruebas bioquímicas se usaron las cepas *S. aureus* RN4220 y RN6390.

2-CARACTERIZACION DE CEPAS DE *S. aureus*: TÉCNICAS CONVENCIONALES

a) BIOTIPIFICACION

El sistema de biotipificación propuesto por Devriese (1984) para *S. aureus*, propone Biotipo A (o ecovar humano) para cepas de origen humano, biotipo B para cepas aisladas de cerdo y aves de corral, Biotipo C para cepas de origen bovino y ovino. El término "ecotipo" es usado para designar biotipos que no están claramente asociados con un simple huésped animal o con huéspedes relacionados. Como cepas controles se usaron cepas de



S. aureus enviadas gentilmente por el Dr. L. A. Devriese. El esquema de las distintas pruebas ensayadas se muestra en la Figura 2.

♣ **Producción de Estafiloquinasa**

Se realizó utilizando un medio base de agar nutritivo con el agregado de fibrinógeno disuelto en buffer fosfato salino al 0.1%. Se mezcló a 55° C durante 10 min con el fin de precipitar la fibrina: inmediatamente antes de verter el medio a las placas de Petri se le añadió plasma de perro a una concentración de 0.5% (75 µl por placa). Se realizó un control sin plasma canino. Las placas fueron incubadas durante 24 hs a 35° C. La presencia de zonas claras o de lisis rodeando las colonias desarrolladas fue debido a la acción de la estafiloquinasa producida.

♣ **Producción de β-hemólisis**

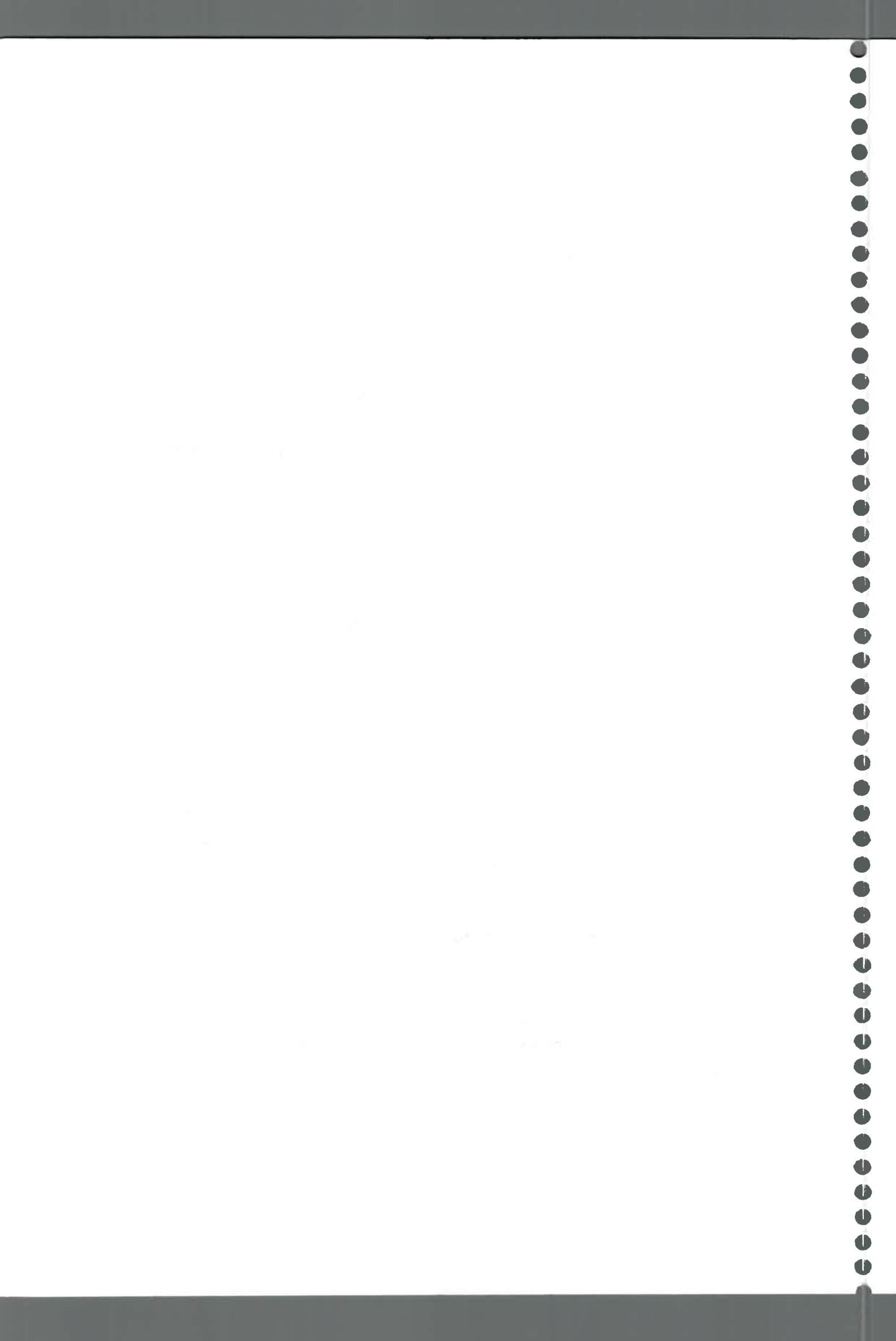
Las cepas aisladas fueron sembradas en placas de agar sangre ovina al 7% e incubadas durante 24 hs a 35° C. La presencia de zonas claras rodeando a la colonia indica la producción de β hemolisinas.

♣ **Coagulación de plasma bovino**

Se mezclaron 0.1 ml de cultivo de 18 hs con 0.5 ml de plasma bovino en una dilución 1:3 realizada en solución fisiológica. Los tubos fueron incubados durante 6 hs a 35° C observándose periódicamente la formación de un coágulo de características firmes registrado como resultado positivo de la prueba.

♣ **Crecimiento en Agar Cristal Violeta**

Las cepas se sembraron en agar conteniendo cristal violeta. Se emplearon dos concentraciones distintas de cristal violeta (6 y 8 µg/ml) e incubadas durante 24 hs a 35° C. Transcurrida la incubación se observó el tipo de colonia desarrollada y las cepas fueron clasificadas como:



A: colonias amarillas con o sin márgenes violetas.

C: colonias azules o violetas con o sin la presencia de un matiz anaranjado.

E: colonias blancas con un tinte azul.

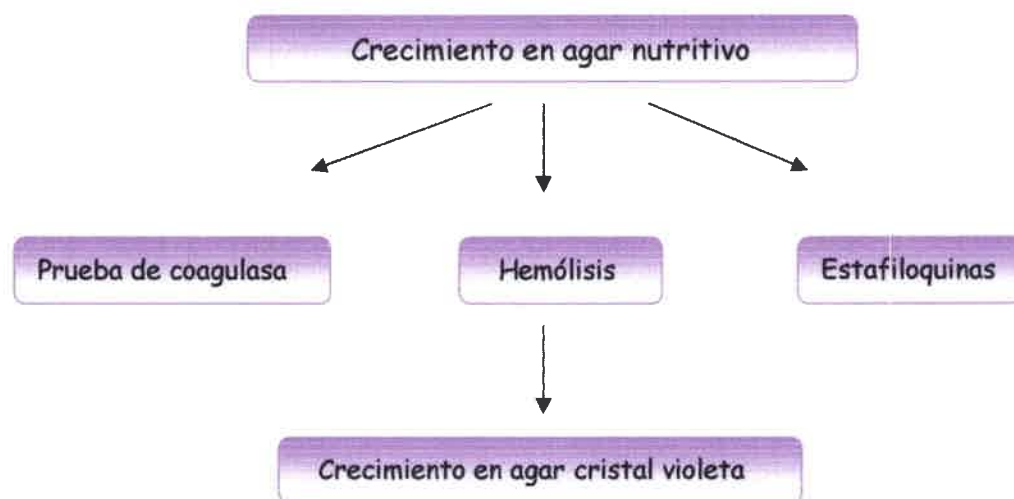
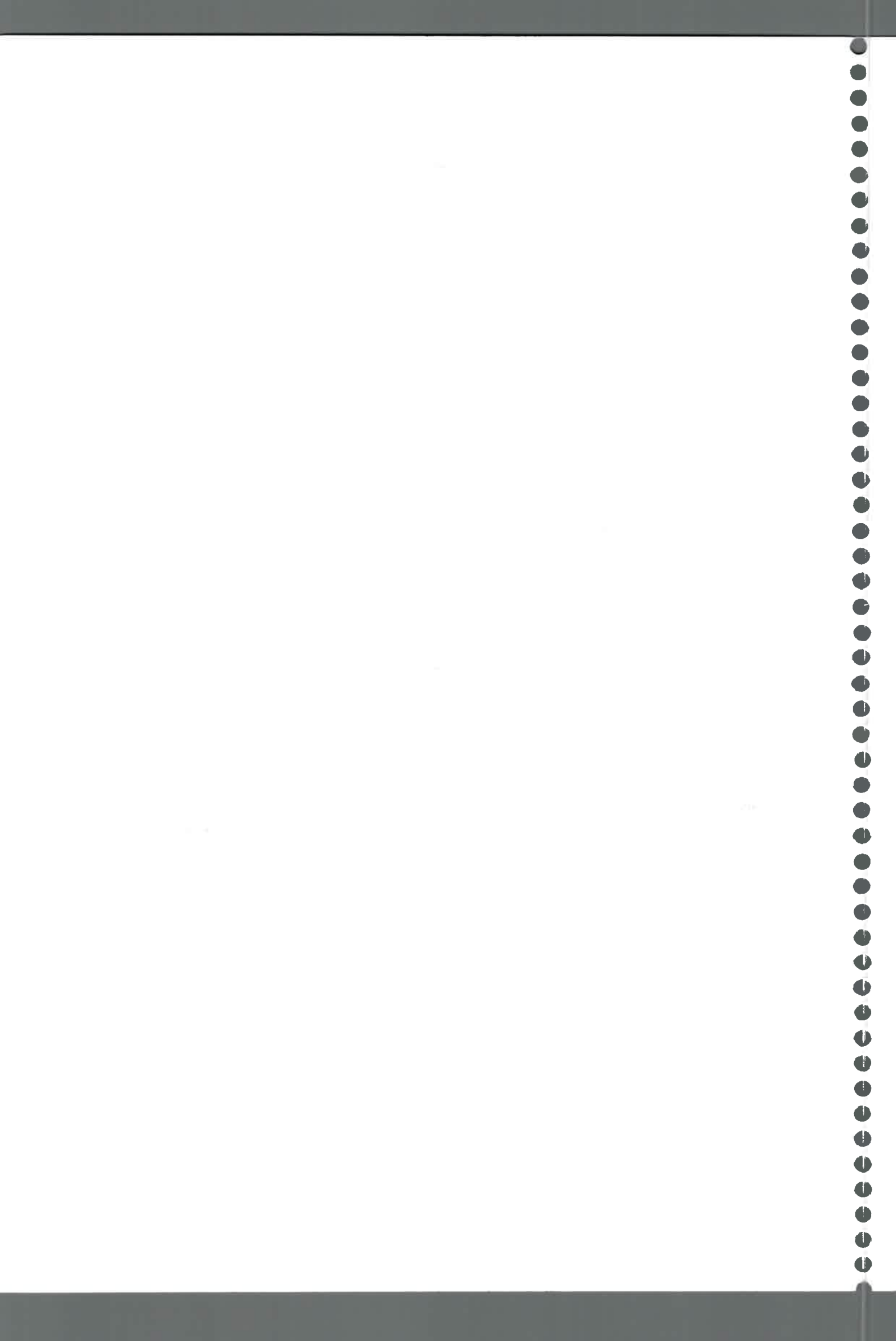


Figura 2: Esquema de las pruebas ensayadas en el sistema de Biotipificación.

De acuerdo a los resultados de las cuatro pruebas se define el ecotipo. El esquema propuesto por Devriese para la clasificación de *S. aureus* se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7: Clasificación por biotipos de acuerdo a los resultados obtenidos al realizar las pruebas bioquímicas del sistema de biotipificación.

Biotipo	Estafiloquinasa	B-hemólisis	Coagulación plasma bovino	Crecimiento agar cristal violeta
Humano	+	-/+	-	C
Bovino	-	+	+	A
Aviar	-	-	-	A
No específico 1	-	+	-	C
No específico 2	-	+	-	A
No específico 3	+	+	-	A
No específico 4	+	+	-	A
No específico 5	-	-	-	C



b) DETERMINACION DE LA RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS

La determinación de resistencia se realizó según el a) método de difusión en disco y b) técnica de dilución en placa (Bauer y col. 1966). Los antibióticos y las concentraciones empleadas se detallan en la sección de Materiales.

a) La resistencia fue determinada mediante discos impregnados con antibióticos (Laboratorios Britania) en agar Mueller-Hinton. Los aislados fueron categorizados como resistentes, intermedios y susceptibles basados en los criterios interpretativos del National Committe for Clinical Laboratory Standars (NCCLS, 1999). En función del diámetro de la zona de inhibición las cepas fueron consideradas como resistentes: diámetro \geq a 10 mm; y sensibles diámetro \leq a 13 mm.

b) Los antibióticos fueron adicionados a placas de Petri estériles a las que inmediatamente se les agregó 25 ml de Agar Mueller-Hinton fundido y templado a 45° C. Se determinó resistencia en función del crecimiento de la cepa.

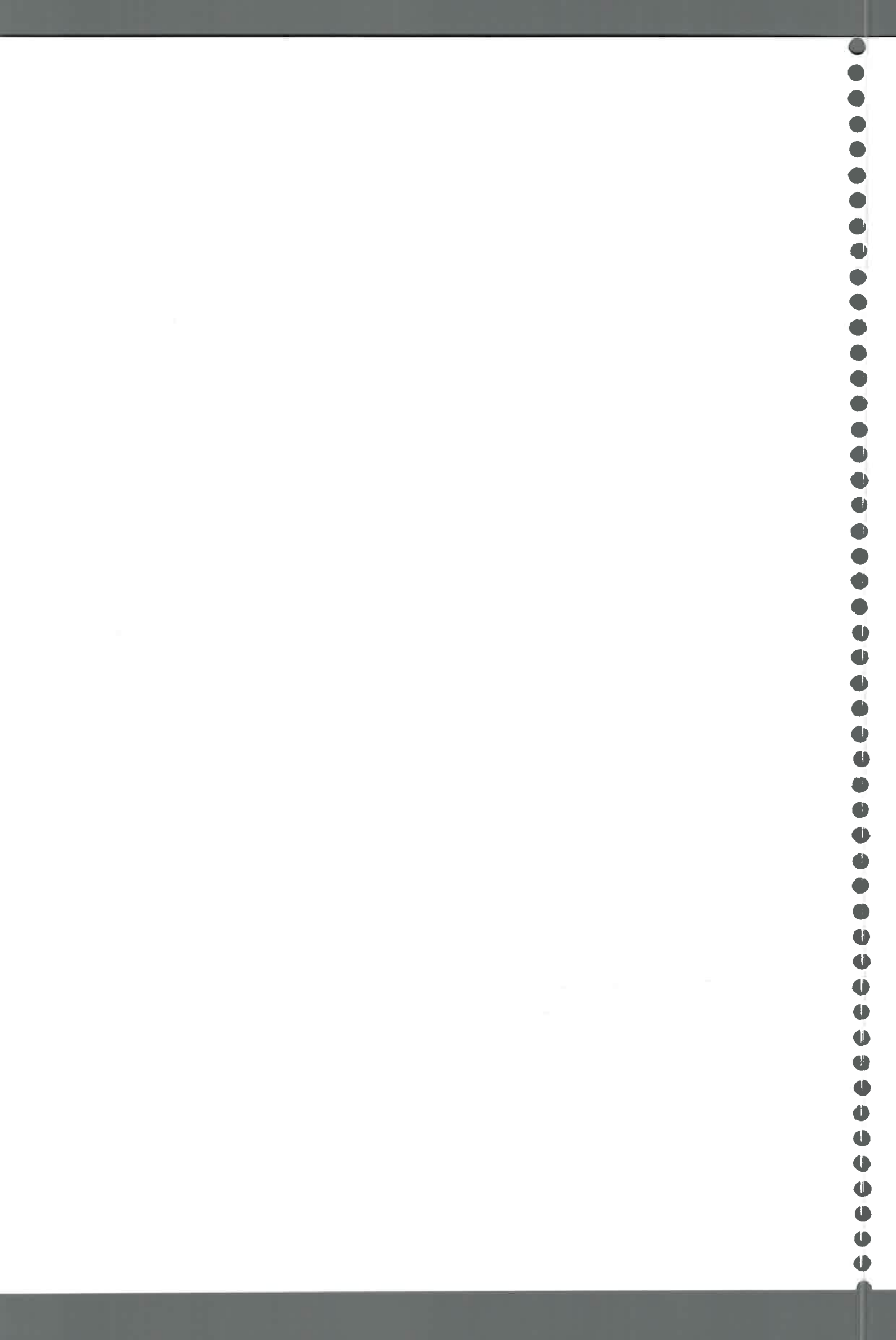
La determinación de cepas MRSA se realizó según las normas implementadas por el NCCLS. Se analizó la resistencia a oxacilina en Agar Mueller-Hinton con discos de 1 ug de oxacilina, incubando las cepas a 33° C durante 48 hs La resistencia fue confirmada sembrando las posibles cepas resistentes en Agar Mueller-Hinton suplementado con 4% de ClNa (0,68 M) conteniendo 6 gr de oxacilina/ml (CDC, 1999).

Las cepas MRSA positivas fueron analizadas mediante ensayos de PCR para la detección del gen *mecA*. En la Tabla 1 se muestran los cebadores empleados y en la Tabla 7 el programa utilizado.

3-CARACTERIZACION DE CEPAS DE *S. aureus*: TÉCNICAS MOLECULARES

a) Extracción de ADN de plásmidos de *S. aureus*

Se optimizó una técnica de extracción de plásmidos de *S. aureus* con el fin de analizar los perfiles plasmídicos en cepas de distintos orígenes. La extracción de ADN de los plásmidos de *S. aureus* se realizó optimizando las condiciones de los siguientes tres métodos:



i- Birboim y Dolly modificado

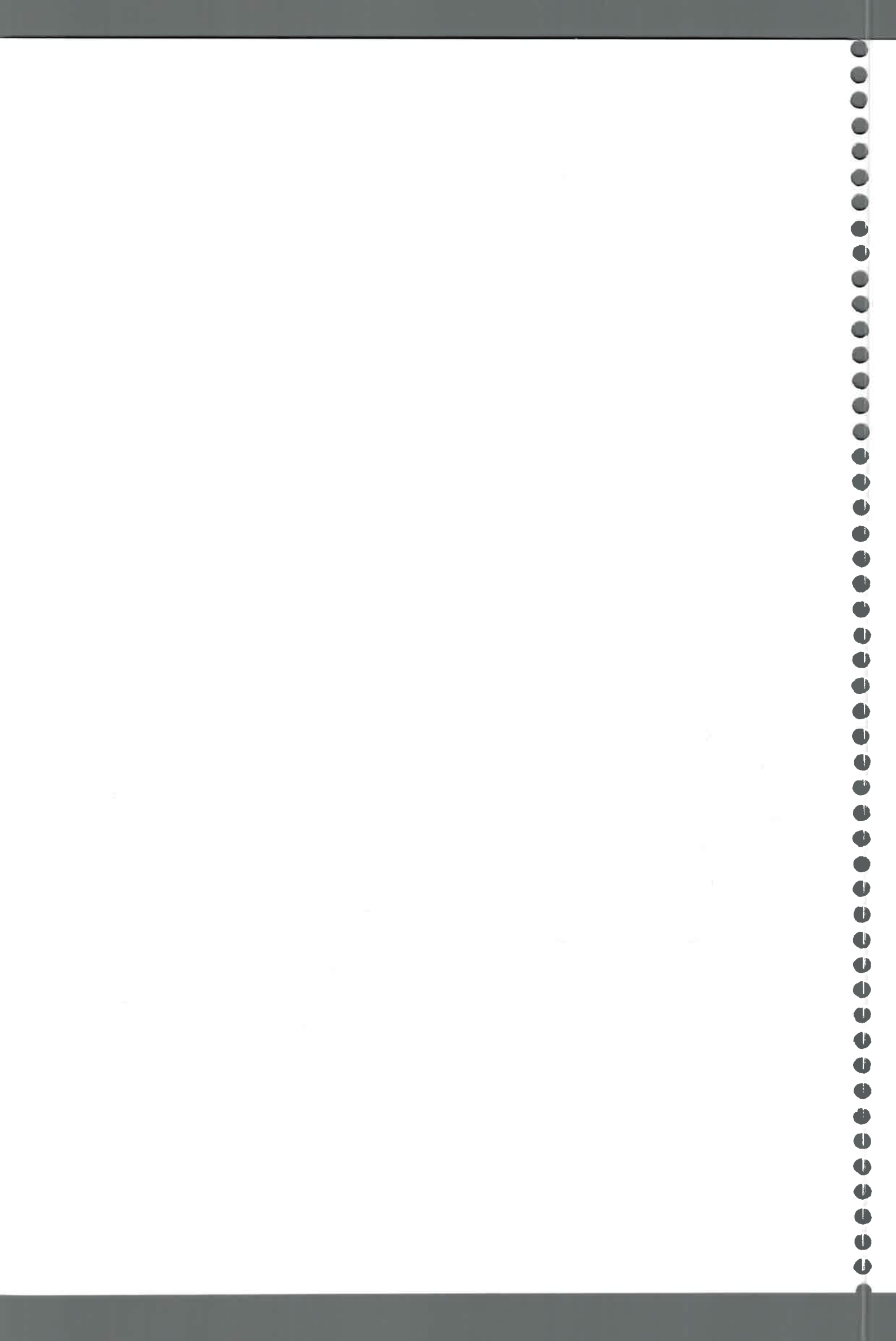
El aislamiento de ADN de plásmidos se realizó mediante una extracción alcalina según Birboim y Dolly modificada (Sambrook y col., 1989). El pellet de 1,5 ml de cultivo de 18 hs de incubación previamente lavado con 700 µl de TE fue resuspendido en 700 µl de TE y 500 µl de acetona y se incubó 5 min en hielo. Se centrifugó para sedimentar las células y se resuspendió en 200 µl de solución de lisis con el agregado de 5 µl de lisostafina (1 mg/ml) y se incubó a 37° C durante 1 h. Luego se agregó 400 µl de solución alcalina y se mantuvo durante 5 min a temperatura ambiente. Para restaurar el pH de la muestra se agregaron 300 µl de solución de neutralización y se dejó 20 min en hielo. Se centrifugó a 13.500 r.p.m. a 4° C durante 15 min, luego se rescató el sobrenadante al cual se le adicionó RNasa (1 µg/ml) se incubó 30 min a 37° C.

ii- Se modificó el método anterior resuspendiendo el pellet con una mezcla de etanol-acetona (1:1) en lugar de un volumen de acetona y un volumen de TE.

iii- Takahashi y Nagano

El pellet de 3 ml de cultivo de toda la noche inoculado en caldo BHI fue resuspendido en 200 µl de solución de lisostafina (5 µl de lisostafina de 1 mg/ml) se incubó 30 min a 37° C, según Takahashi y Nagano (1984). Luego se agregó Solución de Lisis, se incubó 5 min a temperatura ambiente y para neutralizar el pH se usó Solución de Neutralización. Se centrifugó a 10 min a temperatura ambiente, se transfirió el sobrenadante y se realizaron dos extracciones con cloroformo y se precipitó con etanol.

En los tres ensayos se realizó una extracción con 1 volumen de fenol-cloroformo y se centrifugó a 12.000 r.p.m. durante 10 min a 18° C. Para precipitar el ADN se agregaron 2 volúmenes de etanol frío, se incubó la muestra durante 20 min a -80° C o durante 2 hs a -20 °C y luego se centrifugó 13.500 r.p.m. a 4° C durante 15 min El pellet seco fue resuspendido en 20 µl de TE. Las muestras fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % en buffer TAE (Tris-Acetato-EDTA) teñidas con Bromuro de etidio (0,5 mg/ml).



b) Optimización de las técnicas de RAPD-PCR y REP-PCR.

1) Extracción de ADN cromosomal

Un volumen de 1,5 ml de cultivos incubados toda la noche a 37° C con agitación fueron centrifugados 3 min a 6000 rpm., lavados en PBS y resuspendidos en 400 µl de buffer STET. Se añadió 5 µl de lisostafina (1 mg/ml) y se incubaron durante 1 h a 37° C. Luego se calentaron 1 min a 94° C, se agregó 1 µl de RNasa (10 mg/ml), 20 µl de SDS al 10% y 50 µl de proteasa (20 mg/ml), y se incubó a 37° C durante 2 h. Las muestras fueron tratadas con 94 µl de ClNa 3M y con 46 µl de CTAB-ClNa y extraídas con dos volúmenes de fenol-cloroformo. El ADN fue precipitado con etanol al 100% y luego con etanol al 70%. Las muestras se resuspendieron en 30 µl de buffer TE y fueron conservadas a -20°C. El ADN fue cuantificado por lectura a OD₂₆₀ y por visualización en geles de agarosa al 0,8% en buffer TAE con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) usando concentraciones estándar de ADN del fago lambda como marcador de masa. Se analizó la pureza del ADN extraído según la relación OD₂₆₀/OD₂₈₀ como indicador de contaminación proteica y OD₂₇₀/OD₂₆₀ como indicador de contaminación fenólica (Protocolos Promega). Un valor mayor a 1,8 en la relación OD₂₆₀/OD₂₈₀ indica la presencia de RNA y un valor menor la presencia de proteínas. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo con muestras de ADN cuya OD₂₆₀ presentó valores entre 1,8 y 2,0, indicando que las muestras estaban libres de proteínas.

La masa se calculó según la siguiente relación:

$$\mu\text{g/ml} = (\text{OD}_{260} \text{ de la muestra}) \times (1/\text{inversa de la dilución}) \times 50^*$$

$$* \text{OD}_{260} 1,0 = 50 \mu\text{g/ml}$$

Para los ensayos de hibridación se realizaron extracciones preparativas de ADN utilizando 15 ml del cultivo y ajustando las soluciones anteriormente utilizadas a un factor de 3.



ii) Técnica de RAPD-PCR

Las reacciones de amplificación fueron llevadas a cabo en un volumen de 25 μ l conteniendo entre 25 y 50 ng de ADN cromosomal, 3,5 mM Cl_2Mg , 3 μ M de cebador, 200 μ M de cada dNTP (Promega) y 2 IU de *Taq* Polimerasa (Promega), la cual fue agregada luego del primer paso de desnaturalización. A cada tubo se agregó un volumen de aceite mineral para evitar la evaporación. Las reacciones se llevaron a cabo siempre en el flujo laminar y en un lugar diferente donde se realizó la extracción de ADN. La amplificación se realizó bajo condiciones de baja especificidad (Protocolos Promega) en un Termociclador Hybaid, empleando el programa n° 1, el cual se indica en la Tabla 8. Como control negativo, se trabajó con la mezcla de reacción sin ADN y como control positivo, con la mezcla de reacción con un ADN de perfil previamente conocido. Los cebadores utilizados fueron: P6 con un 70% de contenido en bases CG; P11, P13 y P14 con 60% de contenido en bases CG. La secuencia de dichos cebadores se muestra en la Tabla 1 de Materiales.

iii) Técnica de REP-PCR

Se llevó a cabo en un volumen de 25 μ l de reacción. Cada mezcla contenía 3 μ M del cebador, 3,5 mM de Cl_2Mg , 2 IU de *Taq* polimerasa (Promega), 2,5% de dimetil-sulfóxido y cada dNTP a una concentración de 200 μ M. Se agregaron 5 μ l de ADN cromosomal (25- 50 ng). La amplificación fue llevada a cabo bajo condiciones de alta especificidad. El ciclo fue llevado a cabo según Del Vecchio y col. (1995) con ligeras modificaciones y corresponde al programa n° 2 de la Tabla 8. Las cepas fueron ensayadas con el cebador RW3A, homólogo de la secuencia REP-MP13 de *Mycoplasma pneumoniae*, cuya secuencia se muestra en la Tabla 1 de Materiales.

Los productos de amplificación, tanto de RAPD-PCR como de REP-PCR, fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en buffer TAE, con 0,5 mg/ml de bromuro de etidio. La corrida se llevó a cabo a voltaje constante (2,5V/cm) durante 2 h. Los geles fueron digitalizados en un digitalizador (Alpha Innotech Corporation), guardados con formato TIFF (Tagged Image File Format) y fotografiados bajo transiluminador de UV con una cámara Polaroid GelCam.



4- MEZCLAS DE ADN POR RAPD-PCR Y REP-PCR

Se realizaron tres mezclas con ADN puros provenientes de 10 cepas tomadas al azar de cada una de las poblaciones bovinas patógenas, bovinas no patógenas y humanas patógenas con el propósito de encontrar posibles marcadores moleculares asociados a origen y a virulencia. Se trabajó con las diluciones 1/10 y 1/100 de cada mezcla y se ensayaron con cada primer por los métodos de RAPD-PCR y REP-PCR.

5- ELECTROFORESIS DE CAMPOS PULSANTES (PFGE)

El ensayo de PFGE se llevó a cabo según Saulnier y col. (1993) con ligeras modificaciones (1993). A partir de un cultivo incubado toda la noche en caldo cerebro corazón se realizó una dilución 1/50, se incubó a 37° C hasta alcanzar una $OD_{660} = 0,7 - 0,8$ y luego se centrifugó a 8000 r.p.m. 10 min a 14° C. Se lavó con un volumen de SB, en el cual se resuspendió el pellet, se equilibró a 50° C y luego se agregó 5 μ l de LF_{10} y 1 μ l de RNasa (10 mg/ml). Para la preparación de los bloques se agregaron 250 μ l de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 2% y fueron mezclados con igual volumen de las células tratadas. Una vez solidificados, se colocaron en tubos estériles conteniendo 2,5 ml de EC y se incubaron a 37° C durante toda la noche y se lavaron con 12 ml. buffer BL. Se agregó 2,5 ml de BR y proteinasa K (20 mgr/ml), luego se incubaron a 50° C toda la noche. Al día siguiente se lavaron nuevamente con el mismo buffer, en los últimos lavados se agregó PMSF 1 mM. Los bloques se continuaron lavando con buffer TE y posteriormente se reemplazó el buffer TE por buffer de restricción J y se dejó 1 hora a temperatura ambiente, se agregaron 3 μ l de enzima *Sma*I (Promega) y se dejó cortar a temperatura ambiente toda la noche. Antes de realizar la corrida, los bloques se lavaron nuevamente en buffer TE. El gel se preparó con agarosa EEO (SIGMA) al 1% en TBE 0.5%. Como marcador de peso molecular se usaron concatémeros de fago λ . Los ensayos se realizaron en un equipo CHEF-DR III system (BIO-RAD). Las condiciones de corrida fueron las siguientes:

Tiempo pulso inicial: 5 min

Tiempo pulso final: 25 seg.



Tiempo de corrida: 24 h.

Ángulo del campo eléctrico: 120°

Voltaje: 6 V/cm.

Para el análisis de electroforesis en campos pulsantes se usó el criterio de Tenover y col. (1994).

6-ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN

La similitud genética de los aislados, determinada por las técnicas de RAPD-PCR y REP-PCR fue comparada por observación visual y con el software GelWorks 1D Intermediate (UV Products, versión 3.01) según los perfiles de bandas de las cepas ensayadas. Las imágenes fueron normalizadas con el software GW y las bandas fueron asignadas automáticamente. Variaciones en la migración de las bandas requirieron ajuste manual. Los datos obtenidos correspondieron al peso molecular de cada banda, los mismos se incorporaron en una matriz y el porcentaje de similitud obtenido entre dos cepas y los dendrogramas fueron estimados con el software NT-SYS versión 3.0 según el coeficiente de Dice (S_D) (1945) y los coeficientes de correlación de agrupamiento fueron calculados según la media aritmética no ponderada (UPGMA) con ligamiento completo (Sneath y Sokal, 1973; Pielou, 1984).

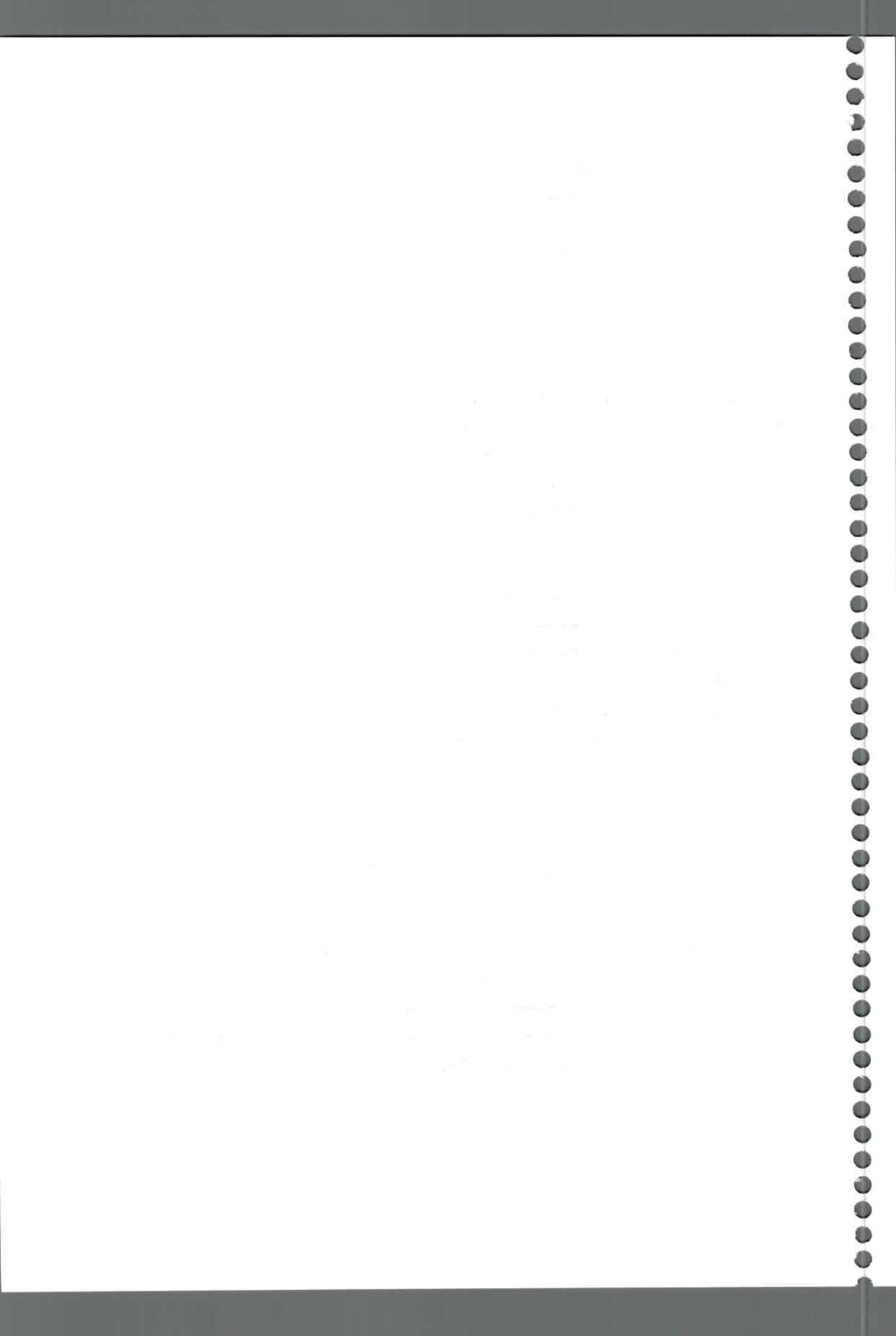
El coeficiente de Dice confiere mayor peso a las coincidencias. Los valores de este coeficiente varían entre 0 y 1 que equivalen a valores de mínima y máxima similitud.

$$\text{Dice } S_D = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Donde a= n° de caracteres en los cuales un estado es compartido por las dos unidades taxonómicas; b= n° de caracteres en los cuales un estado se encuentra presente en la primera unidad taxonómica y no en la segunda, c= n° de caracteres en los cuales un estado está ausente en la primera unidad taxonómica y presente en la segunda.

Para RAPD-PCR dos perfiles de bandas fueron considerados diferentes si diferían en la presencia o ausencia de al menos tres bandas, en cambio para REP-PCR se consideraron diferentes con dos bandas (Olive y Bean, 1999).

El análisis de coordenadas principales se realizó mediante el programa NT-SYS-pc. Los análisis de los datos se describen en la Figura 3.



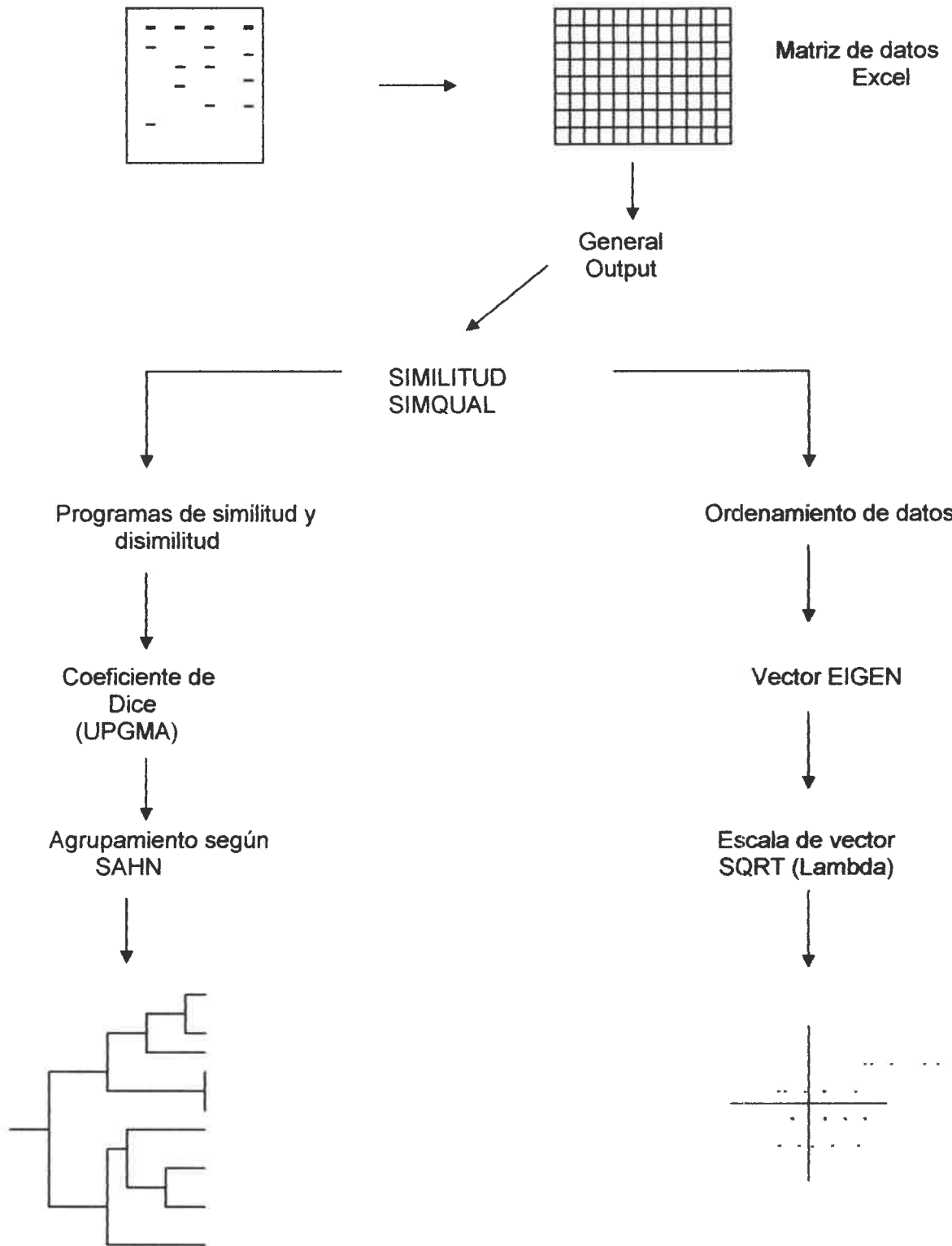
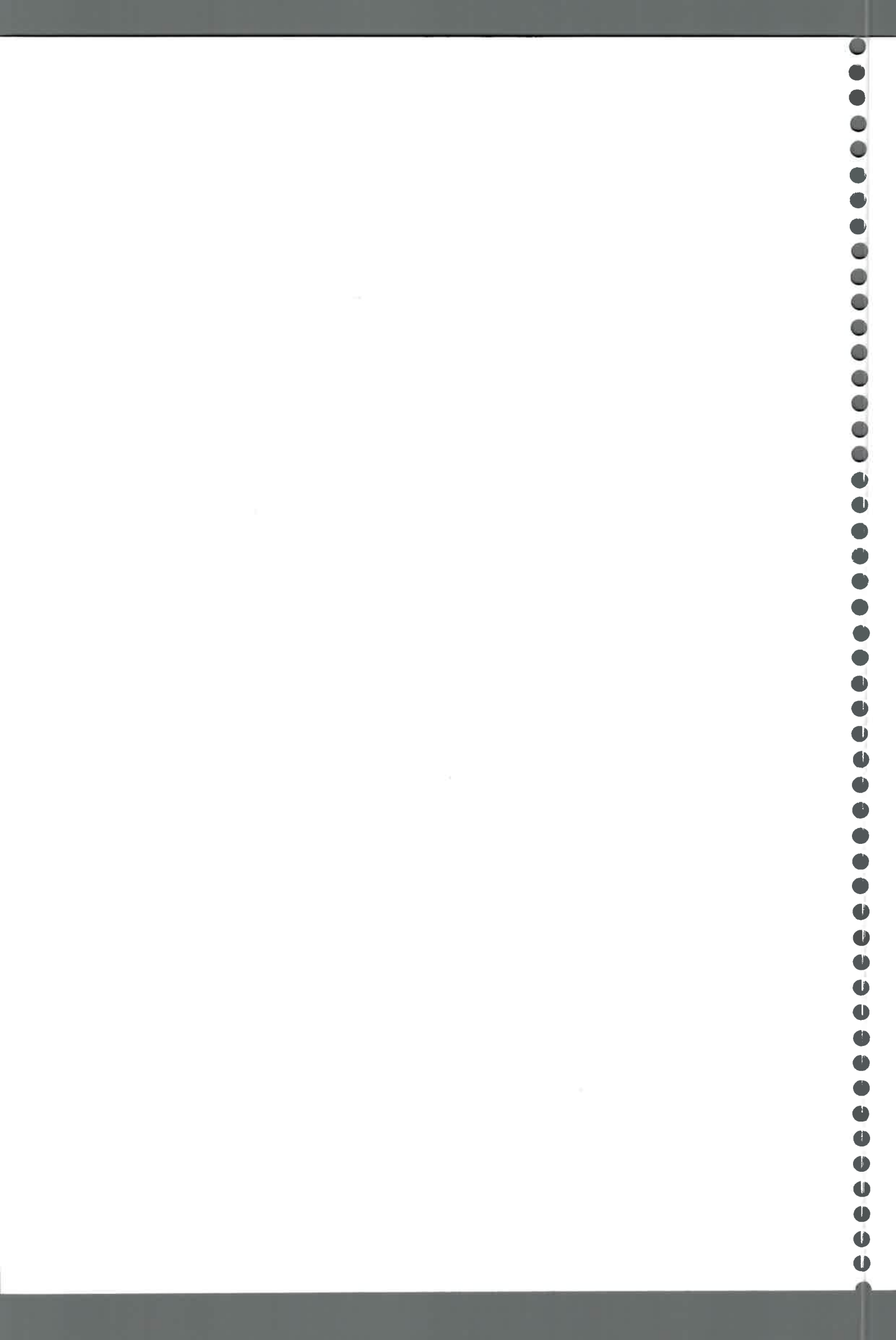


Figura 3: Representación esquemática de los pasos a seguir para el análisis taxonómico de los datos con el Software NTSYS-pc.



7- ANALISIS ESTADISTICO

a) Análisis de discriminación

La probabilidad que dos aislados no relacionados de la población se ubiquen en dos grupos diferentes fue determinada de acuerdo a la fórmula de Hunter y Gaston (1988):

$$D = 1 - \frac{1}{N(N-1)} \sum n_j (n_j - 1)$$

Donde N = número total de cepas en la muestra, s = número total de perfiles descritos, n_j número de cepas pertenecientes al tipo j^{th} .

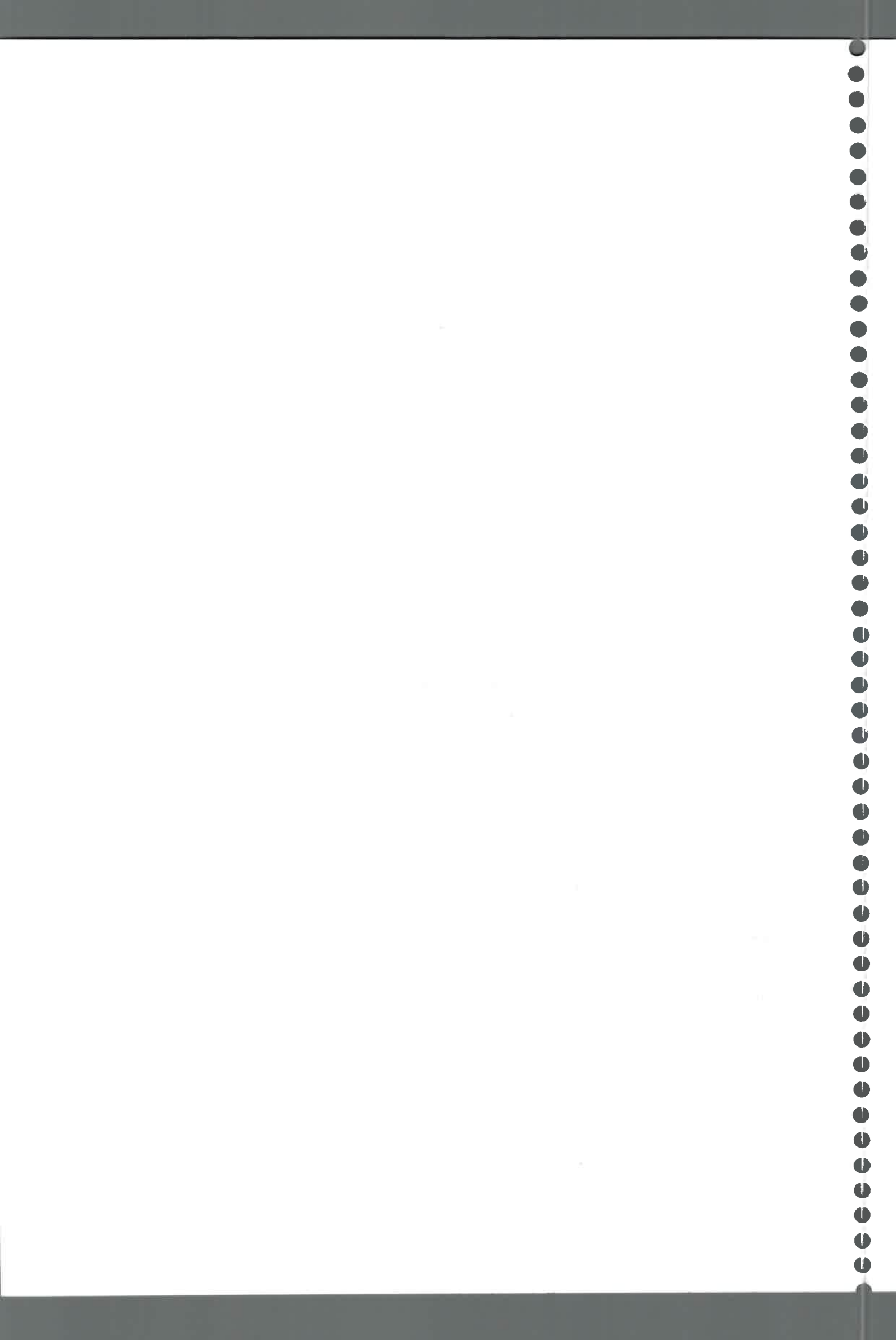
b) Índice de diversidad

La diversidad entre poblaciones fue calculada según el Índice de Shannon-Wiener (Chakraborty y Rao, 1991) modificada para el análisis de RAPD. La misma es definida como:

$$H_o = \left(\sum_{i=1}^n p_i \log_2 p_i \right) / n$$

Para cada cebador usado, H_o es la diversidad asociada a una banda determinada; p_i es la frecuencia de i^{th} bandas y n es el número de bandas generadas por los cebadores analizados.

El índice H_o varía entre 0 (monomorfismo) y 1 (alto polimorfismo). Para cada origen H_o fue calculado según el promedio de todos los cebadores analizados para determinar la diversidad entre orígenes (H_o). La significación estadística fue calculada según el test *t-Student's*.



c) Test Chi²

El test de Chi² se realizó con los datos obtenidos para evaluar relaciones epidemiológicas estadísticamente significativas.

8-ANÁLISIS MOLECULAR DE GENES RELACIONADOS A LA VIRULENCIA

Se determinó la presencia de genes y polimorfismos en diferentes *loci* de virulencia entre cepas de *S. aureus* de diferentes orígenes, mediante la amplificación por PCR. Para cada gen se utilizaron los cebadores que se indican en la Tabla 1 de Materiales. Los programas de amplificación empleados se muestran en la Tabla 8 de esta sección. Las concentraciones de reactivos usadas fueron: 200 μM de cada primer, 1,25 mM de CIMg₂, 0,2 mM de dNTP y 2 IU de TAQ ADN polimerasa (Promega y Sigma). Los productos de amplificación fueron sembrados en geles de agarosa TBE al 2% y 3%, dependiendo del peso molecular del producto amplificado.

a) Determinación de polimorfismos

a-1) Gen proteína A (*spaA*)

Se emplearon los cebadores *spa1*, *spa2* y *spa3*, *spa4*. En la Figura 4 se muestran las regiones amplificadas, respectivamente para cada par de cebadores. Se utilizaron los programas 3, 4 y 5.

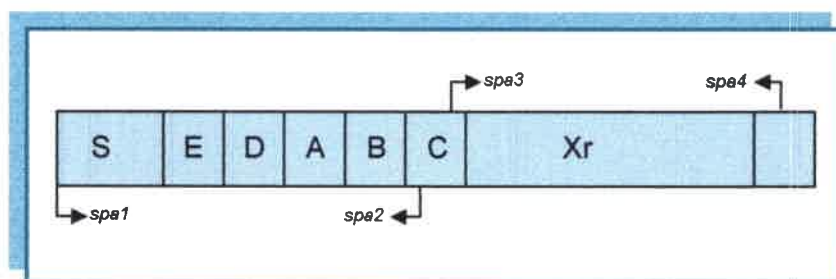


Figura 4: Diagrama esquemático del gen de la proteína A. Se indica la localización de cada cebador (*spa1*, *spa2*, *spa3* y *spa4*). S: secuencia señal; regiones E, D, A, B y C: sitio de unión de inmunoglobulinas; Xr: región variable repetida y Xc: extremo carboxilo terminal de la región Xr.



a-2) Gen coagulasa (*coa*)

Se emplearon los cebadores *coa1* y *coa2*. En la Figura 5 se muestra la región amplificada. Para la amplificación del gen se utilizó el programa nº 6.

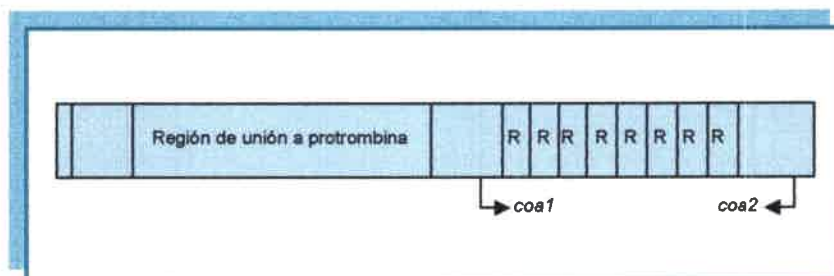


Figura 5: Diagrama esquemático del gen de la coagulasa. Se indica la localización de cada cebador (*coa1* y *coa2*). R: unidad de secuencia repetida de 81 bp.

a-3) Gen de adhesión a fibrinógeno (*clfA*)

Se emplearon los cebadores *clfA1* y *clfA2*. En la Figura 6 se muestra la región amplificada. Para la amplificación de las regiones se empleó el programa nº 6.

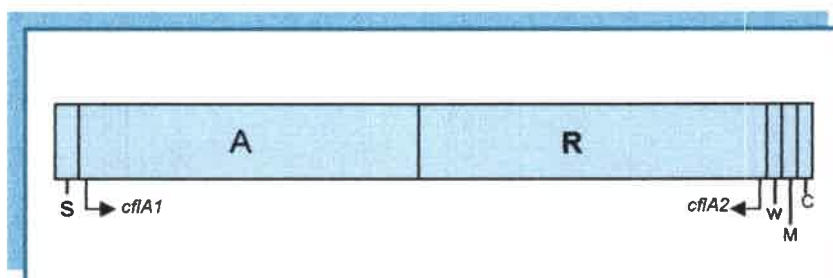
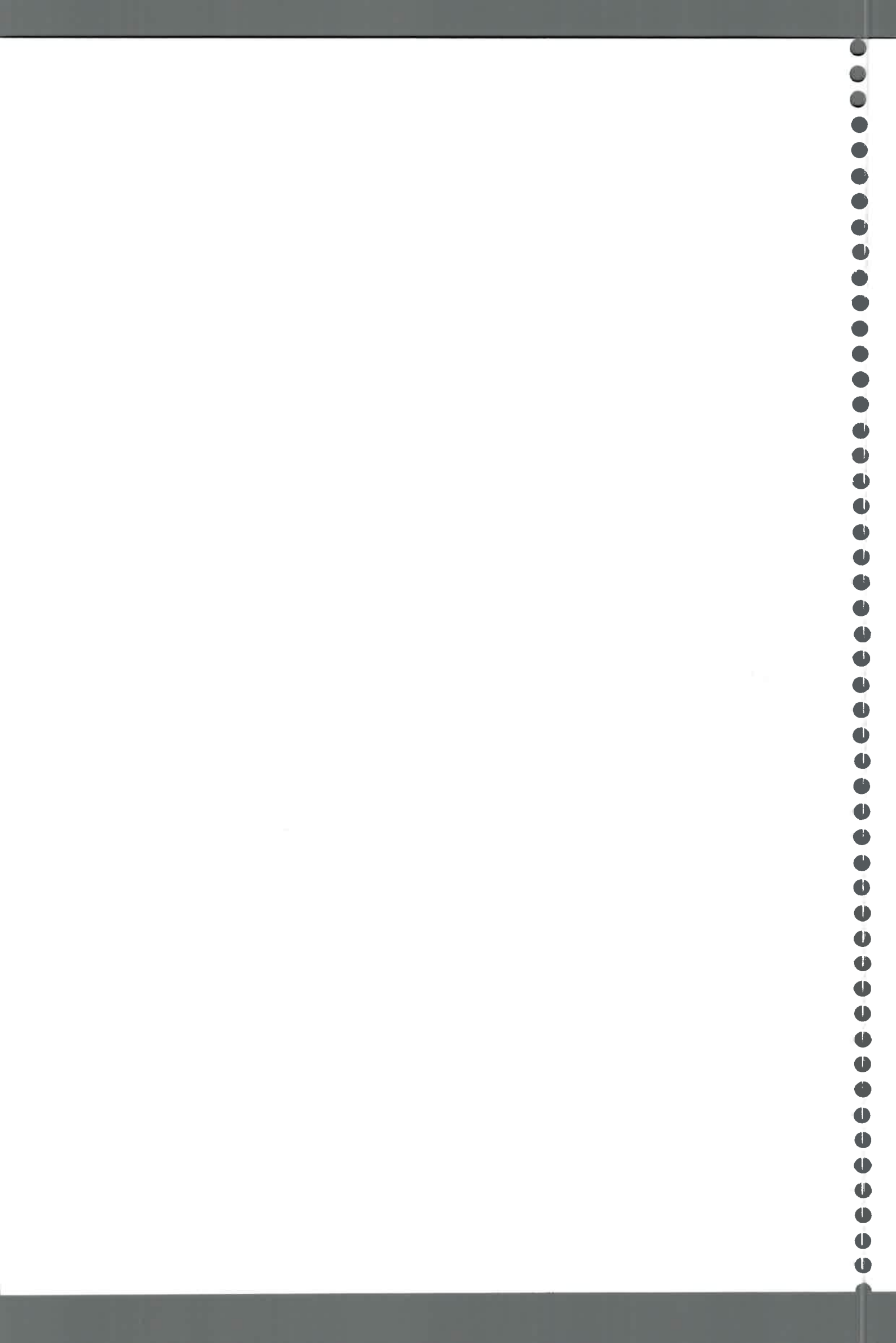


Figura 6: Diagrama esquemático del gen de adhesión a fibrinógeno. Se indica la localización de cada cebador (*clfA1* y *clfA2*). S: señal peptidasa; A: unidad de secuencia no repetida; R: unidad de secuencia repetida.; W: unidad de pared celular; M: unidad de membrana; C: extremo carboxilo terminal.



a-4) Gen de adherencia a colágeno (*cna*)

Se realizó la amplificación por PCR del gen *cna*, dominios A y B con los cebadores *cna1*, *cna2* y *cna3*, *cna4* (Figura 7). Para la amplificación de las regiones se utilizaron los programas nº 8 y nº 9.

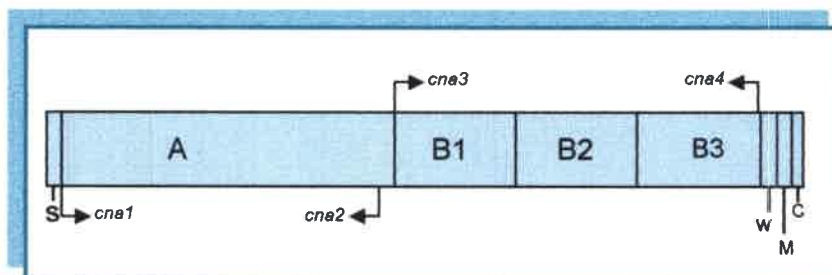


Figura 7: Diagrama esquemático del gen de adherencia a colágeno. Se indica la localización de cada cebador (*cna1*, *cna2*, *cna3* y *cna4*). S: señal peptidasa; A: unidad de secuencia no repetida; B1, B2 y B3 unidad repetidas de 561 bp.; W: unidad de pared celular; M: unidad de membrana; C: extremo carboxilo terminal.

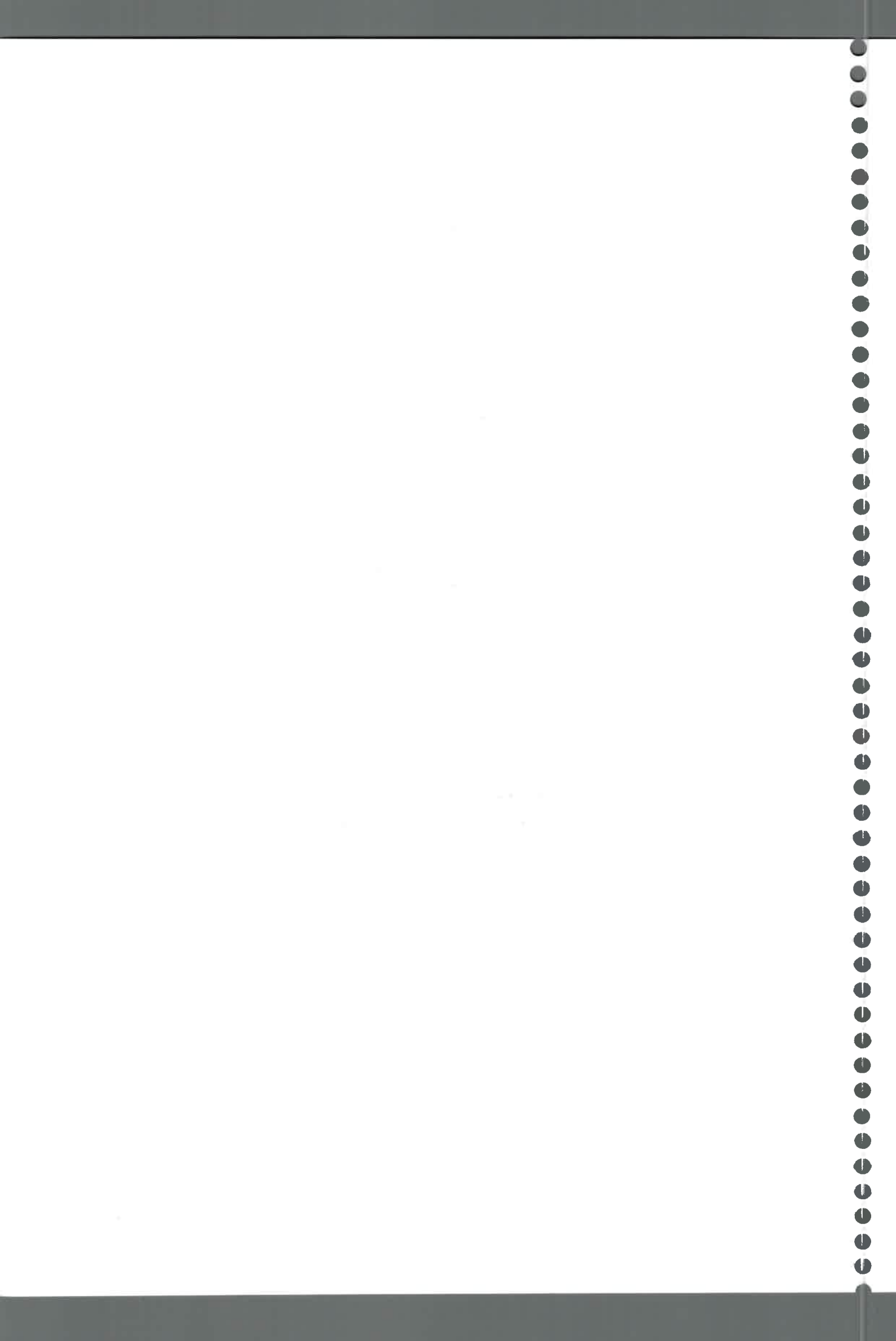
b) Determinación de presencia de genes

b-1) Tipo de cápsula (*gen cap*)

El tipo de cápsula fue determinado mediante la amplificación por PCR utilizando los cebadores *cap5A* y *cap5B* para la detección de tipo de cápsula 5 y los cebadores *cap8A* y *cap8B* para la detección de tipo de cápsula 8. Para la amplificación de los genes se utilizaron los programas nº 10 y nº 11, respectivamente.

b-2) Gen enteroxina A (*sea*)

Se utilizaron los cebadores *sea1* y *sea2*. Se utilizó el programa nº 12.



b-3) Gen regulatorio *agr*

Se determinó la clase de gen *agr* utilizando los cebadores *agr1A*, *agr 1B*, *agr2A*, *agr2B*, *agr3A* y *agr3B*. En la Figura 8 se muestran las regiones amplificadas. Se utilizaron los programas nº 13 y nº 14.

b-4) Gen *hld*

Se amplificó el gen *hld*, que codifica para el RNA III (Figura 8). Se utilizó el programa nº 15.

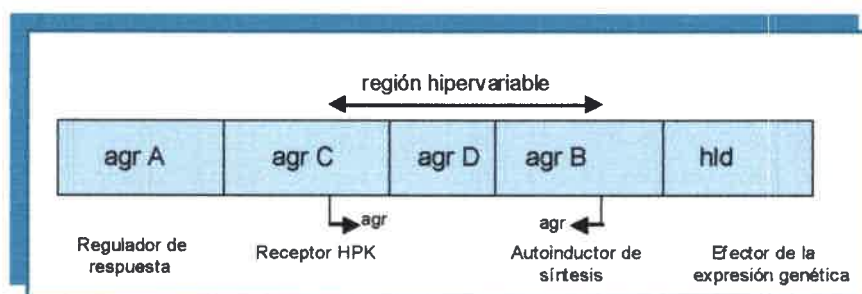


Figura 8: Diagrama esquemático de los genes *agr* y *hld*. Se indica la localización de los cebadores (*agr*).

b-5) Gen regulatorio *sae*

i) Determinación de la presencia del gen

Se determinó la presencia del gen *sae* mediante la amplificación de los fragmentos *saeR* y el fragmento *saeR-saeS* más 200 bp upstream 5' de dicho gen (Figura 9).

El diseño de los *cebadores* se realizó a partir de la secuencia de la región *sae* utilizando el software Primer3 Output (www.genome.wi.mit.edu). Se emplearon los pares de cebadores S1- S4 y S7- S4 para amplificar el segmento *sae-cbs* y los cebadores S1 y S3 para amplificar la región *saeR* (Tabla 1). Los programas de PCR utilizados fueron los nº 16



y 17, respectivamente. Como control se usó la cepa de *S. aureus* pRC9, que posee el fragmento *EcoI-ClaI* de la región *sae* clonada en el plásmido *pMKsae*.

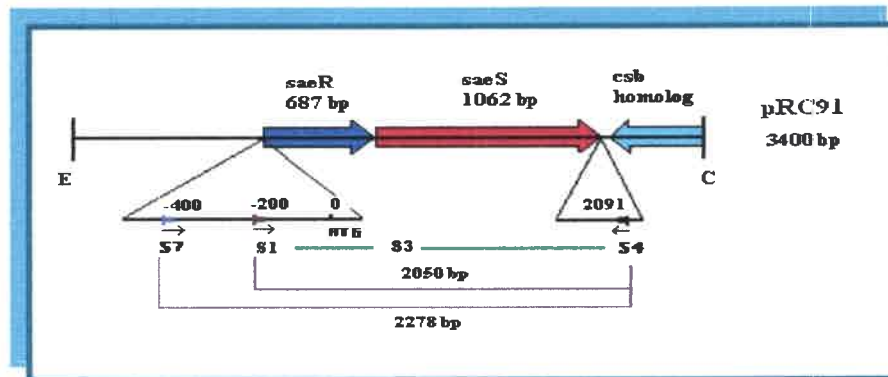


Figura 9: Diagrama esquemático del gen *sae*. Se indica la localización y orientación del operón *saeR-saeS*; de los primers S₇, S₁ y S₄; y parte de un marco de lectura abierto

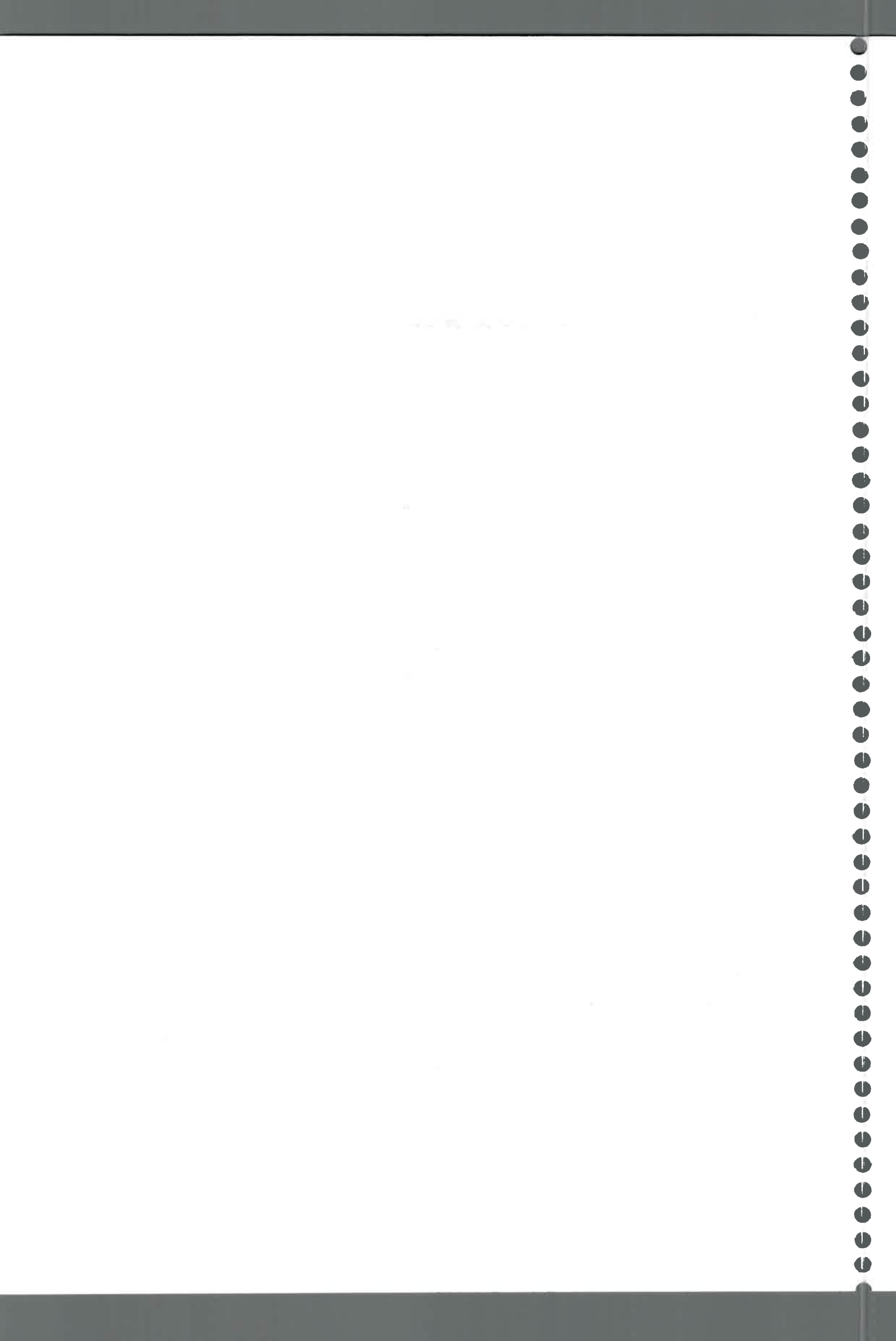
ii) Determinación de polimorfismos

Los productos obtenidos a partir de la amplificación del gen *saeR* fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoRI* y *AccI* para determinar polimorfismos.

La mezcla para realizar la reacción de digestión se realizó en un volumen final de 30 μ l, 3 μ l del buffer de reacción, 3 μ l de suero de albúmina bovina diluído 1/10, 1 μ l de enzima y entre 5-10 μ l del producto amplificado. Los productos de la digestión fueron sembrados en geles de agarosa TAE al 2%.

9- DETERMINACIÓN DE HEMOLISINAS

Los ensayos de determinación de hemolisinas α y β en placas de agar sangre de carnero se realizaron para relacionar las mismas con el gen *sae*. La determinación cualitativa de las hemolisinas se llevó a cabo usando dos tipos de agar sangre preparados con TSA como medio base y suplementados con sangre de conejo y carnero al 7 %, respectivamente. Se sembraron estrias de las cepas a analizar y se incubó a 37 °C durante

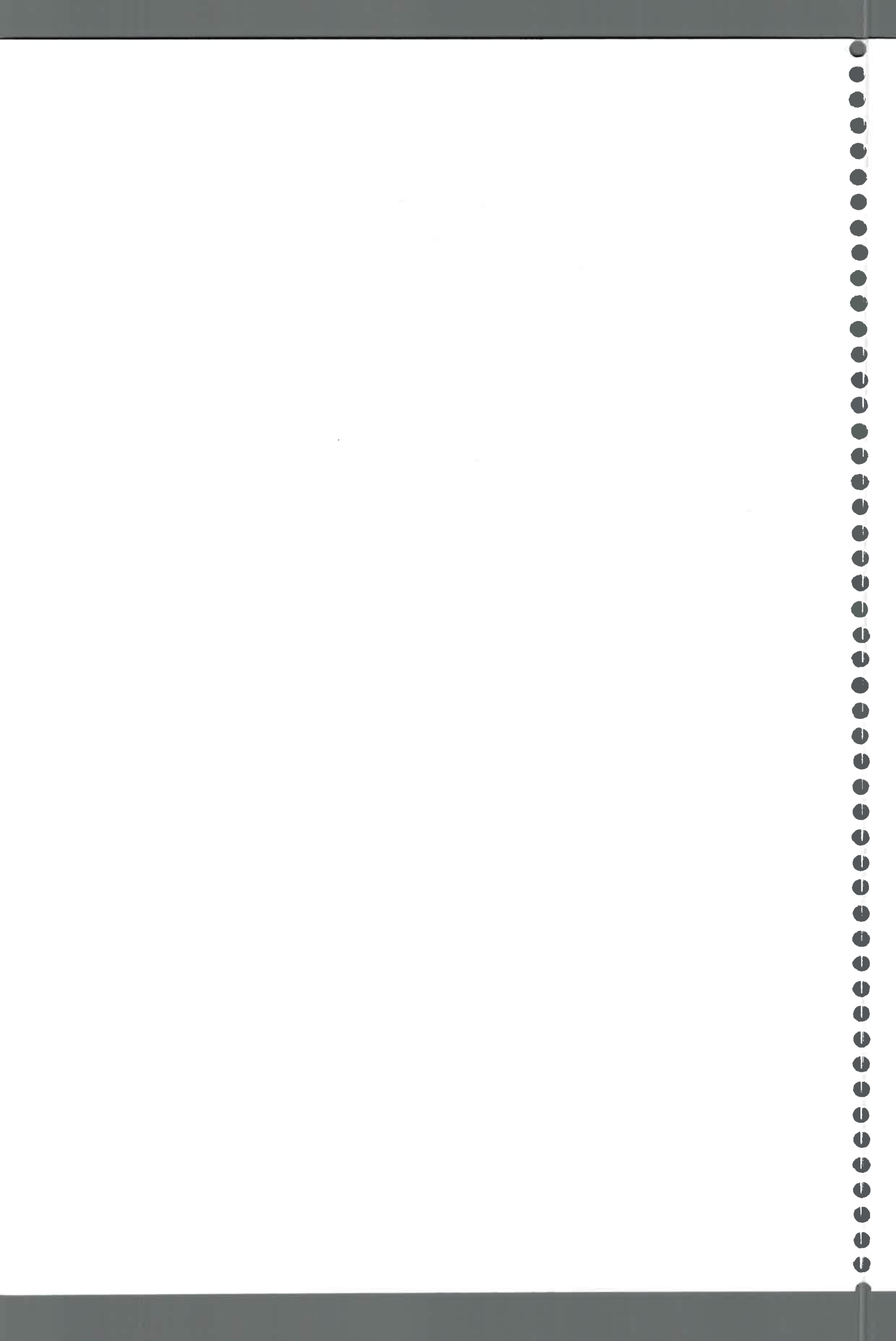


18-24 horas La α y β hemolisina fueron identificadas de la siguiente manera:

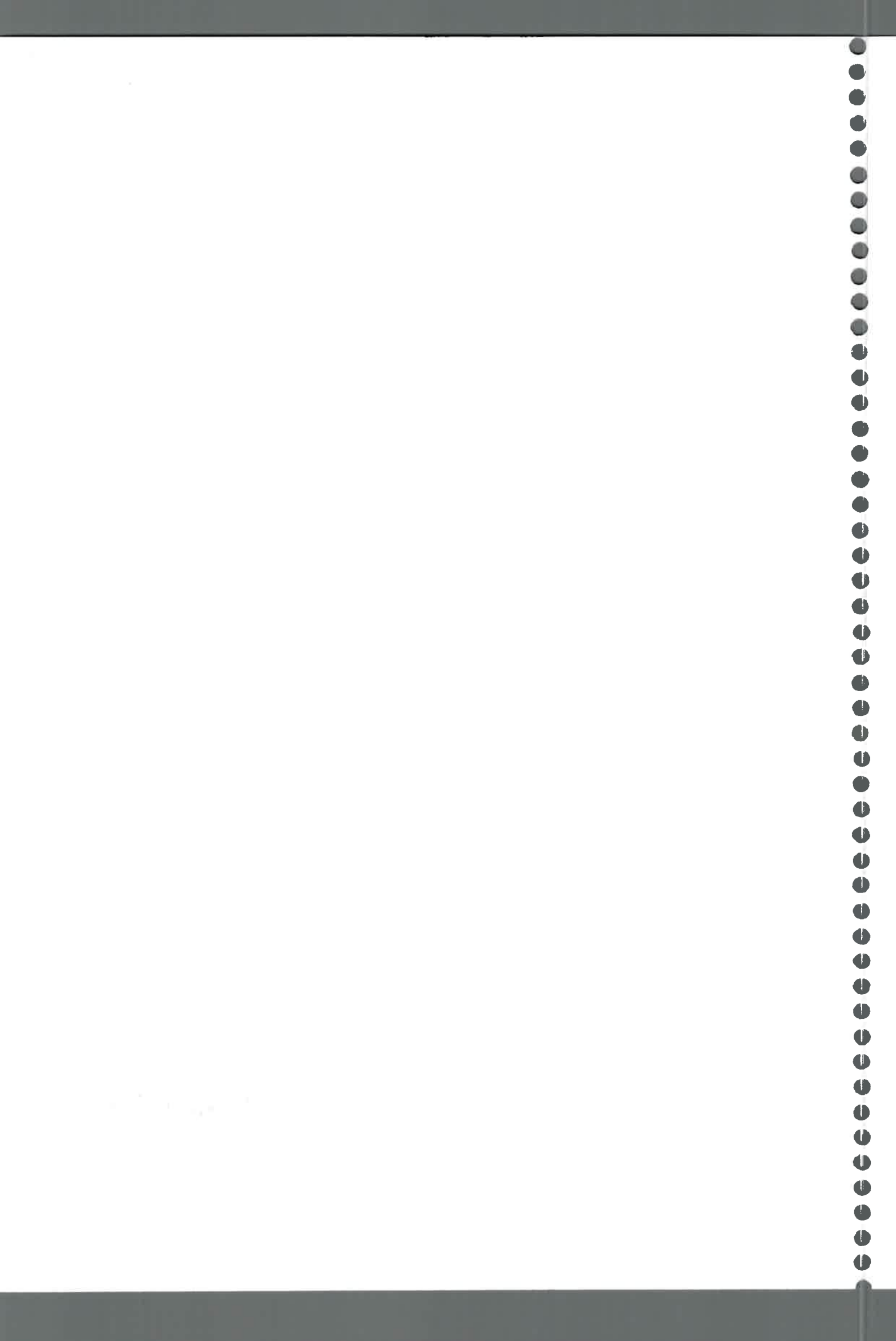
- ✓ α - hemolisina: por hemólisis total sobre agar sangre de conejo.
- ✓ β - hemolisina: por hemólisis parcial sobre agar sangre de carnero y por su característica de completar la hemólisis luego de incubar las placas a 4 °C durante 18 horas

10- DETERMINACIÓN DE COAGULASA

El ensayo de determinación de coagulasa se realizó para confirmar los resultados obtenidos mediante la amplificación por PCR el gen *sae*. Un cultivo de cada cepa de 15 hs de incubación en caldo BHI fue diluido 1/80 en BHI-Cm e incubado 3 hs a 37° C en agitación, 200 rpm, hasta fase exponencial. Diluciones al 1/2 del sobrenadante del cultivo en PBS se incubaron a 37° C con igual volumen de una dilución 1/2 de plasma en PBS. La lectura se realizó a las 4 hs, y el título se determinó como la inversa de la última dilución que muestra signos de coagulación visible.



Resultados



1- AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE *Staphylococcus aureus*

a) Identificación mediante pruebas bioquímicas

Se aislaron 212 cepas de diferentes orígenes, las cuales fueron identificadas como *Staphylococcus* pertenecientes a la especie *aureus*. Según el esquema de identificación propuesto en la sección de métodos. Setenta cepas fueron aisladas de huéspedes humanos de las cuales 49 correspondieron a aislados de episodios clínicos y 21 a portadores sanos, 99 provenientes de cuartos mamarios de vacas con mastitis subclínica, 35 de alimentos y 8 de sitios relacionados a la contaminación de los alimentos.

Las características de las colonias fueron diferentes de acuerdo al origen de las cepas, por ejemplo las colonias de las cepas aisladas de huéspedes humanos de episodios clínicos, producían pigmentos amarillos o naranja, en cambio las cepas aisladas de portadores, alimentos y bovinos en general producían pigmentos blancos o amarillo pálido.

También se observó que en las placas conteniendo agar sangre de carnero, aproximadamente el 16 % del total de las cepas no producían α -hemólisis y el 80 % de las cepas bovinas producían β -hemólisis al igual que las cepas humanas.

2-CARACTERIZACION DE CEPAS DE *S. aureus*: TECNICAS CONVENCIONALES

a) Biotipificación

En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos a partir de la biotipificación según el esquema propuesto por Devriese (1985).

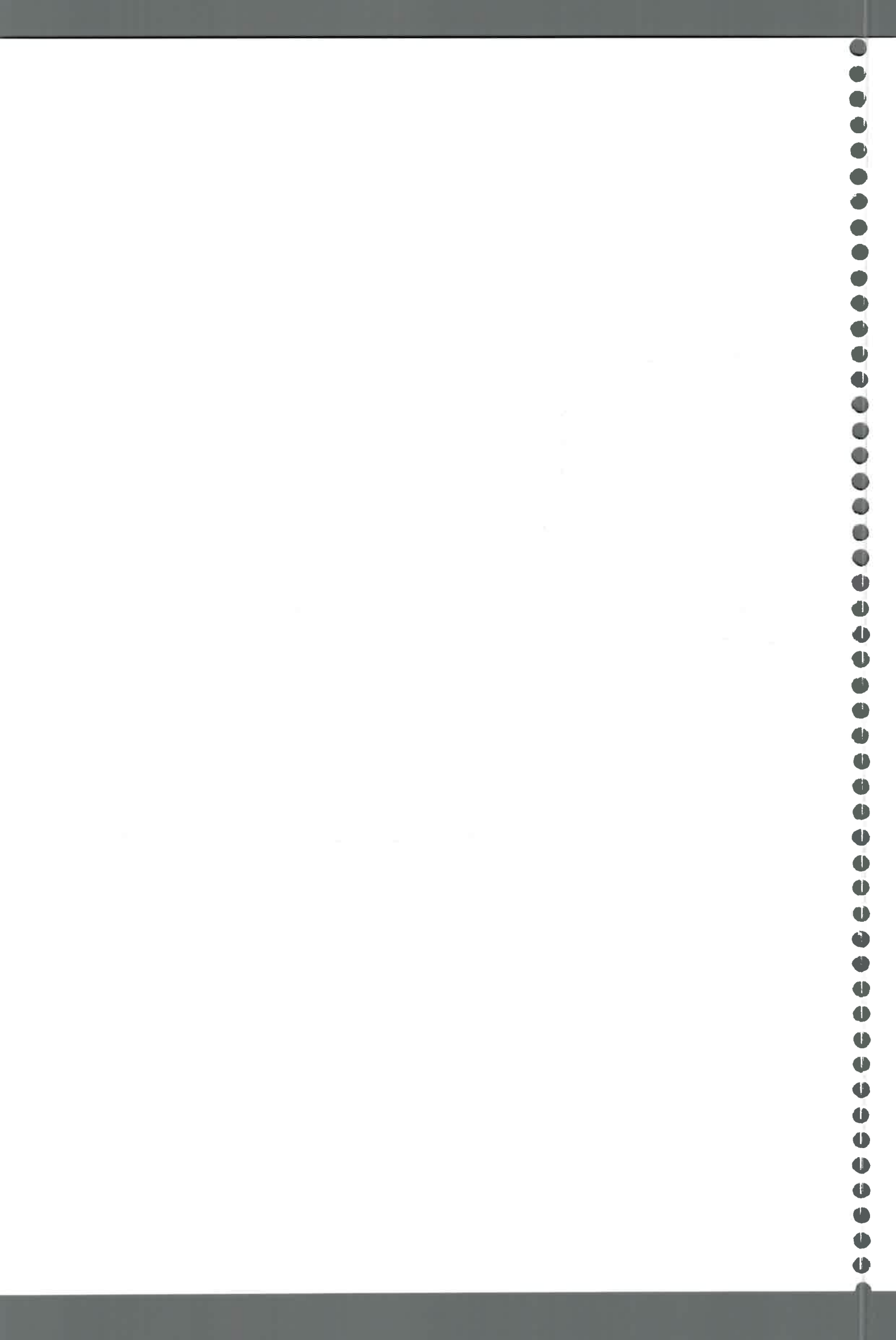


Tabla 9: Biotipificación de cepas de *S. aureus* aisladas de distintos orígenes.

BIOTIPO	ORIGEN / N° DE CEPAS										TOTAL	
	Episodios Clínicos		Portadores sanos		Leche bovina		Alimentos		Relacionadas a alimentos			
BOVINO	0	0%	0	0%	46	46%	3	8%	2	25%	51	24%
HUMANO	20	41%	5	24%	12	12%	2	6%	0	0%	39	18%
AVIAR	2	4%	1	5%	0	0%	2	6%	0	0%	5	2%
NE1	5	10%	8	38%	18	18%	1	3%	1	12%	33	15%
NE2	2	4%	1	5%	15	15%	25	71%	1	12%	44	21%
NE3	4	8%	2	9%	1	1%	0	0%	1	12%	8	5%
NE4	15	31%	3	14%	1	1%	0	0%	2	25%	21	10%
NE5	1	2%	1	5%	6	6%	2	6%	1	12%	11	5%
TOTAL	49		21		99		35		8		212	

*NE= Biotipo no específico.

Se identificaron 8 biotipos diferentes; de los cuales 3 fueron huésped – específico (humano, bovino, aviar) y 5 no específicos (biotipos 1 a 5). El 45% de todos los aislados de *S. aureus* pertenecieron a un biotipo huésped específico. En los aislados humanos sólo 3 cepas (4%) pertenecían al ecotipo aviar. Ninguna cepa aislada de huésped humano fue tipificada como ecotipo bovino. En los aislados bovinos, el ecotipo bovino fue el prevalente, representando el 46%. Entre los aislados de alimentos, el 71% perteneció al biotipo NE2. El ecotipo humano y el biotipo NE4 fueron encontrados en la mayoría de las cepas aisladas de huéspedes humanos de episodios clínicos, representando el 41% y 31%, respectivamente. En cambio, el ecotipo humano y el biotipo NE1 fueron los prevalentes en las cepas aisladas de portadores sanos, 24% y 38%, respectivamente. En la Tabla 10 se muestra el número de cepas pertenecientes a los distintos biotipos en relación al sitio de infección en cepas humanas aisladas de episodios clínicos y de portadores. No se encontraron asociaciones entre los biotipos y el sitio de infección. La Tabla 11 muestra el número de cepas bovinas pertenecientes a diferentes biotipos y su distribución en los distintos tambos. El ecotipo bovino fue el más asociado con las infecciones en cuartos mamarios bovinos.

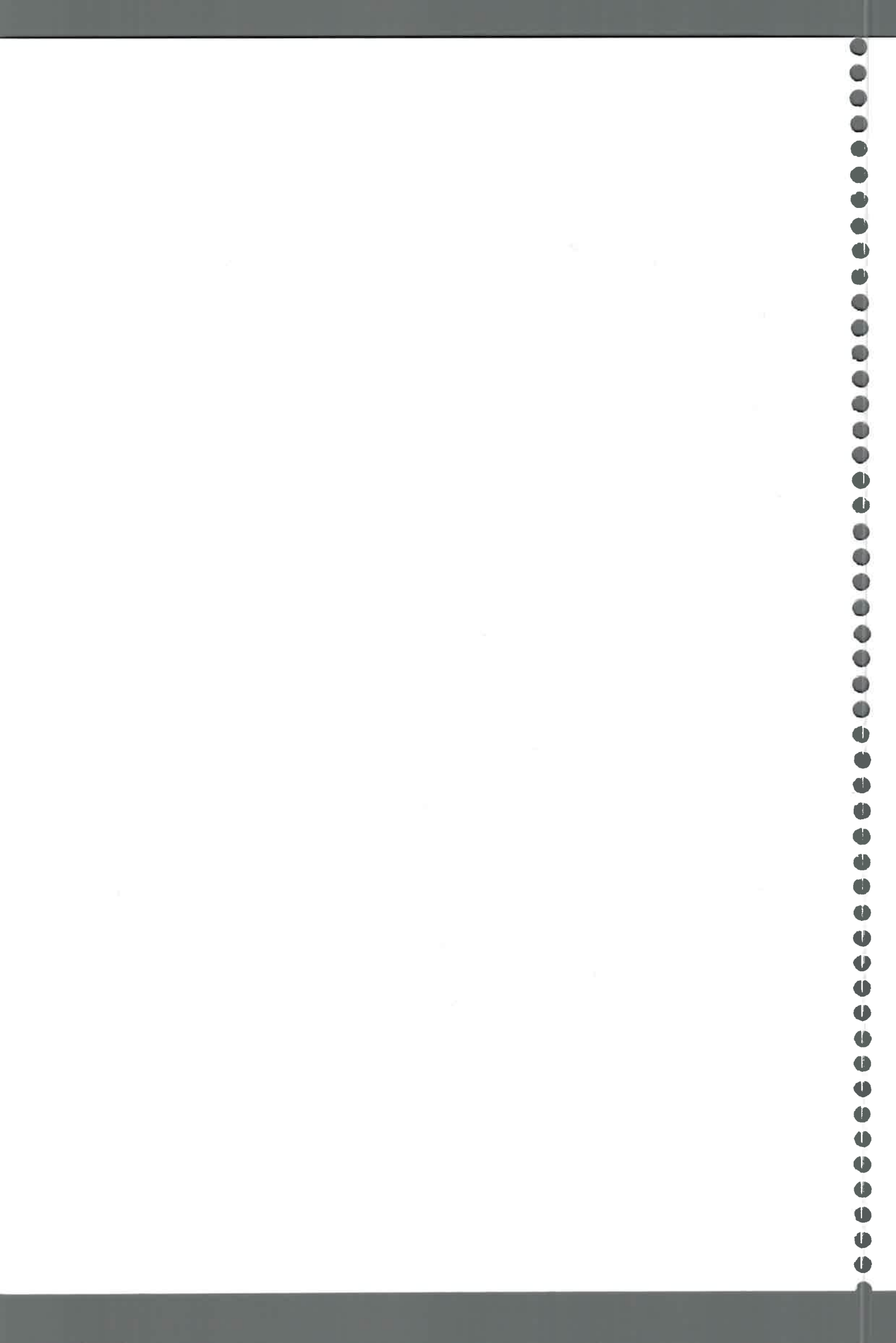


Tabla 10: Biotipificación de cepas de *S. aureus* aisladas de huéspedes humanos.

BIOTIPO	Piel	Material Respiratorio	Catéter	Hemo cultivo	Herida quirúrgica	Osteomielitis	Orina	Secreción ocular	Portadores	TOTAL
Humano	5	1	3	3	4	1	1	2	5	25
Bovino	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Aviar	0	0	1	0	1	0	0	0	1	3
NE1	1	1	0	1	1	1	0	0	8	13
NE2	0	1	0	0	1	0	0	0	1	3
NE3	2	0	0	2	0	0	0	0	2	6
NE4	3	2	3	3	1	1	2	0	3	18
NE5	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2
TOTAL	11	5	7	10	8	3	3	2	21	70

Tabla 11: Biotipificación de cepas de *S. aureus* aisladas de vacas con mastitis subclínicas pertenecientes a los diferentes tambos.

BIOTIPO	Tambo A	Tambo B	Tambo C	Tambo D	Tambos Bs. As.	TOTAL
Humano	3	0	5	2	0	10
Bovino	5	3	2	10	34	54
NE1	2	1	0	2	13	18
NE2	2	1	1	2	4	10
NE3	0	0	0	0	0	0
NE4	1	0	0	0	0	1
NE5	2	1	0	1	2	6
Total	15	6	8	17	53	99

En la Figura 10 se muestra el dendrograma construido con los resultados obtenidos a partir del análisis de biotipos. El cálculo del índice de discriminación para la técnica de biotipificación calculado según el índice de Hunter-Gaston fue de 0.8.



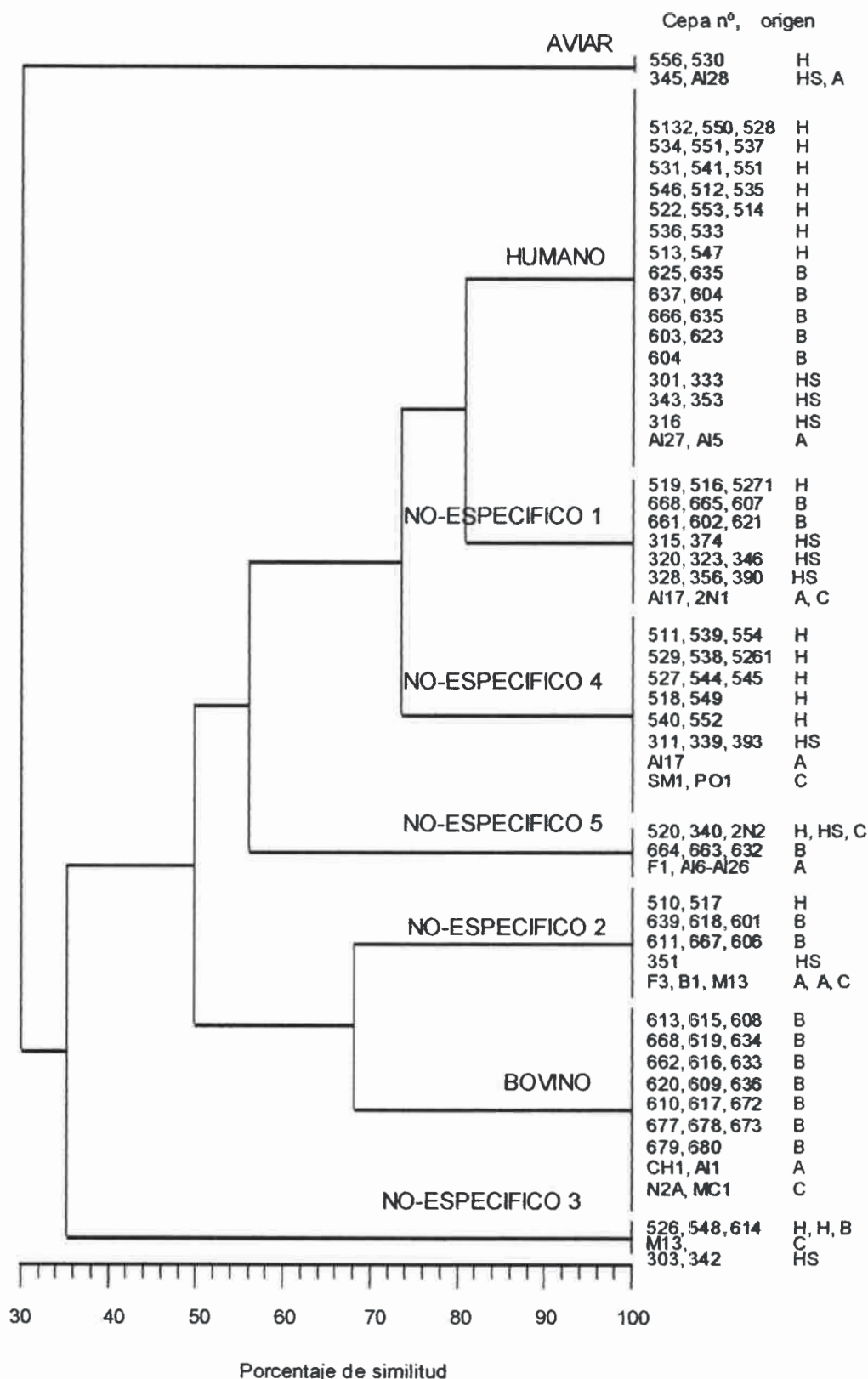


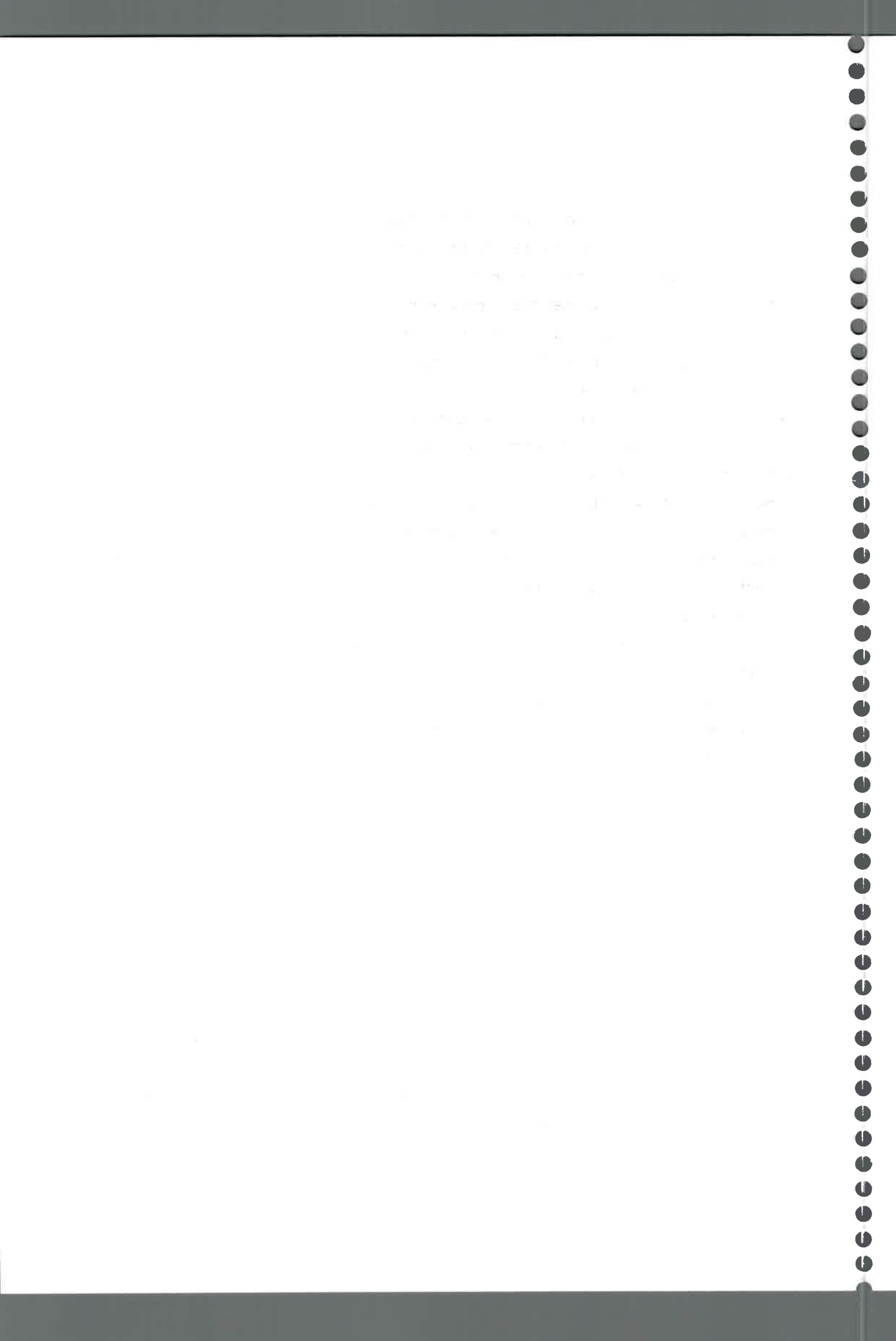
Figura 10: Dendrograma construido mediante el algoritmo de UPGMA basado en el coeficiente de Dice (S_D) obtenido luego de la comparación de biotipos de cepas de *S. aureus* de distintos orígenes.



b) Determinación de la resistencia a antibióticos

Un total de 169 cepas aisladas de huéspedes humanos (episodios clínicos n=49; portadores n=21) y bovinos (n= 99) caracterizadas como *S. aureus* por las pruebas bioquímicas y por biotipificación fueron analizadas para su resistencia a los diferentes antibióticos por la técnica de siembra en placa, conteniendo la concentración adecuada de cada antibiótico. Se analizaron diferentes antibióticos para las cepas bovinas y humanas, ya que la antibióticoterapia de la clínica médica humana difiere de la veterinaria. Para las cepas humanas se ensayaron los siguientes antibióticos: eritromicina, penicilina, vancomicina, tetraciclina, noboviocina, cefalotina, kanamicina, ampicilina y oxacilina. Para las cepas bovinas se ensayaron: eritromicina, penicilina, tetraciclina, noboviocina, cefalotina, kanamicina, ampicilina, oxacilina, espiramicina y gentamicina con las concentraciones explicadas en Materiales. Las cepas aisladas de alimentos (n= 43) fueron ensayadas solo para la resistencia a metilina ya que resultó interesante analizar este tipo de resistencia debido a que las cepas MRSA son las más patógenas a nivel clínico y su detección en alimentos estaría indicando la contaminación de los mismos con cepas provenientes de humanos. Para la determinación de resistencia se utilizó oxacilina ya que es más resistente a la degradación que metilina, detecta cepas hetero-resistentes y provee resultados más confiables.

En las Tablas 12, 13 y 14 se muestran los perfiles de resistencias en las cepas aisladas de huéspedes humanos de episodios clínicos, de portadores y aisladas de huésped bovino, respectivamente. La mayor resistencia encontrada fue para penicilina (45%), representando un 73% en las cepas aisladas de humanos y un 26% en las cepas aisladas de bovinos. Todas las cepas analizadas (100%) fueron sensibles a vancomicina. Catorce cepas fueron resistentes a oxacilina, representando el 8%. Se encontró que 110 cepas (65%) fueron resistentes a uno o más de los antibióticos ensayados. Se observó un total de 37 diferentes perfiles de resistencia a antibióticos en las cepas aisladas de episodios clínicos, 11 en las cepas aisladas de portadores y 14 en las cepas aisladas de huéspedes bovinos, 47 perfiles para la totalidad de las cepas. El perfil más común para la totalidad de las cepas considerando resistencia a un solo antibiótico fue penicilina, y el perfil penicilina-ampicilina para la resistencia a múltiples antibióticos. Las cepas humanas presentaron los mayores porcentajes de resistencia y se encontraron 3 perfiles en común en las poblaciones de episodios clínicos y portadores (Amp; Pn-Amp y Pn-Amp, indicados con *). Es importante destacar que 22 cepas (31%) aisladas de huéspedes humanos (episodios y portadores) fueron resistentes a 4 o más antibióticos. Cabe mencionar que el 19% de las



cepas aisladas de portadores humanos fueron resistentes a meticilina y que de ellas el 6% (4/70) correspondió a aislados proveniente de portadores. El 87% (9/70) y el 50% (50/99) de las cepas humanas y bovinas, respectivamente fueron resistentes a los antibióticos ensayados. Al comparar las cepas de episodios clínicos y bovinas se encontraron tres perfiles de resistencia en común, estos perfiles correspondieron a un antibiótico (Amp, Sm y Tc, indicados con ¹).

Tabla 12: Resistencia a antibióticos en cepas de *S. aureus* aisladas de huéspedes humanos

PERFIL	CEPA	Resistencia a antibióticos										
		Pn	Amp	Er	Sm	Tc	Gn	Km	Nb	Cf	Oxa	Vn
0	510, 521, 523, 533, 552, 556, 557	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	520, 555 ¹	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
2	543 ^{*1}	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	544 ¹	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
4	517	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S
5	516, 534, 535, 548, 549 ^{**}	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
6	551	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
7	512 ^{***}	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
10	515	S	R	R	S	S	S	S	R	S	S	S
11	531	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
12	540	S	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
13	545	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
14	522	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
15	528	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S
16	529	R	S	R	S	S	S	S	R	S	S	S
17	539	R	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
18	545	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
19	554	R	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S
20	519	R	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S
21	513, 550, 553	R	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S
22	5261	S	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S
23	538	R	S	R	S	R	S	R	S	S	S	S
24	547	R	R	S	S	S	S	R	S	S	R	S
25	5271	R	S	R	S	S	S	R	S	S	R	S
26	546	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S
27	537	R	R	S	R	S	S	S	S	S	R	S
28	524	R	S	R	S	S	S	R	R	S	R	S
28	526	R	S	R	R	R	S	S	R	S	S	S
30	527	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	S
31	5322	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	S
32	536	R	R	S	R	R	S	S	R	S	S	S
33	511	R	R	R	R	S	S	R	R	S	S	S
34	530	R	R	S	R	R	S	R	R	S	S	S
35	542	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S
36	525	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	S
37	532	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S

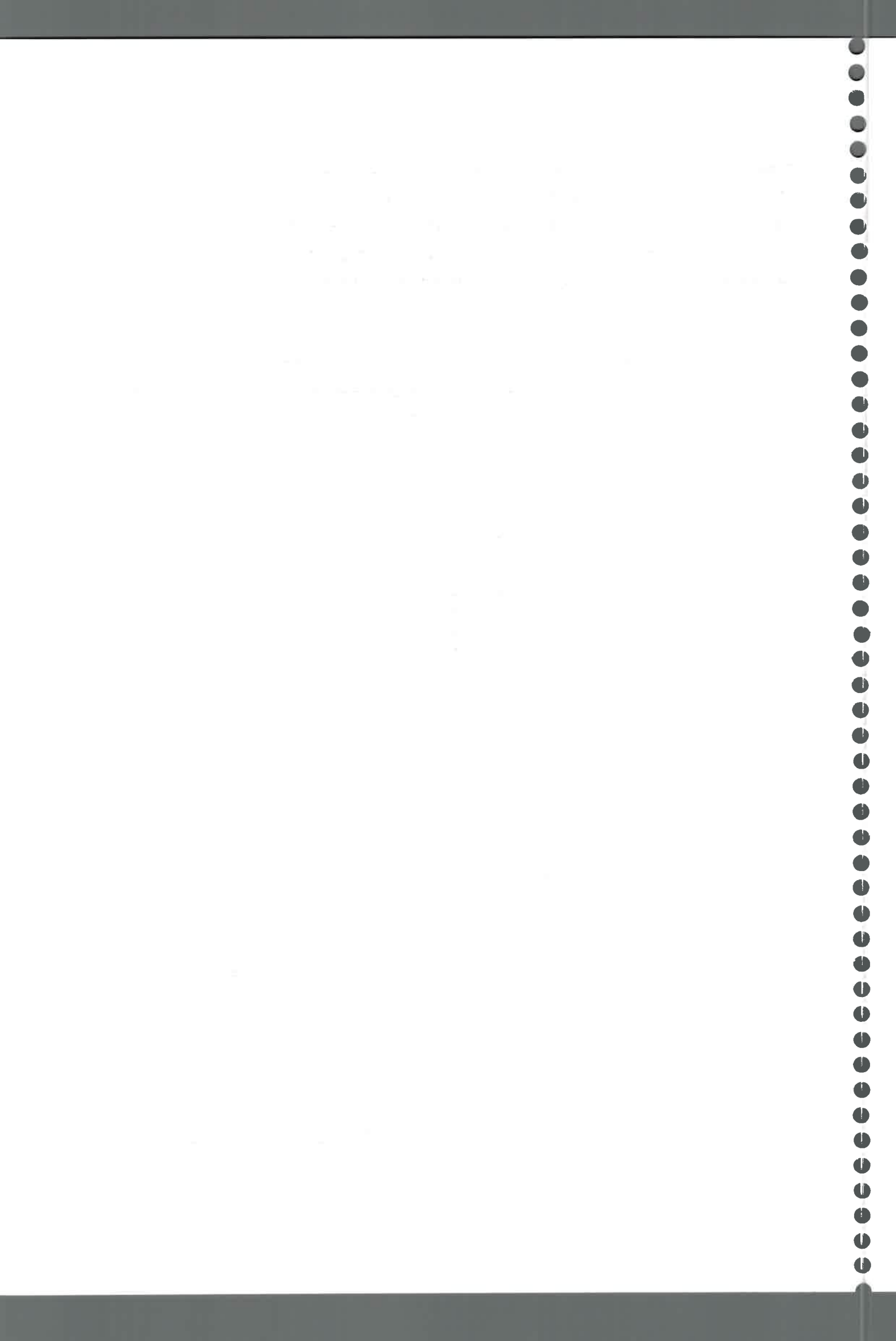


Tabla 13: Resistencia a antibióticos en cepas de *S. aureus* aisladas de portadores

PERFIL	CEPA	Resistencia a antibióticos										
		Pn	Amp	Er	Sm	Tc	Gn	Km	Sp	Cf	Oxa	Nb
0	240, 253	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	242 *	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	201, 215, 216, 246, 290, 293, 245, 256 **	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	274	S	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S
5	203, 239, 243	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S
6	211 ***	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	S
7	233	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
8	223	R	S	R	S	S	S	R	S	S	S	S
9	220	R	S	S	R	S	S	R	S	S	R	S
10	228	R	S	R	R	R	S	R	S	S	S	S
11	251	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S

Tabla 14: Resistencia a antibióticos en cepas de *S. aureus* aisladas de huéspedes bovinos

PERFIL	CEPA	Resistencia a antibióticos										
		Pn	Amp	Er	Sm	Tc	Gn	Km	Sp	Cf	Oxa	Nb
0	613, 601, 611, 660, 609, 615, 614, 606, 607, 604, 603, 602, 665, 605, 617, 667, 628, 620, 623, 625, 626, 638, 622, 624, 708, 712, 715, 718, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 682, 680, 681, 683, 685, 687, 690, 692, 697, 699, 700, 701	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
1	632, 634, 640	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
2	706, 707 ¹	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
3	608, 618, 621, 635, 636, 709, 714, 715, 719, 608, 609, 616, 618	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
4	612, 616, 610, 619, 633, 637, 711, 617, 624, 629, 630 ¹	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
5	631 ¹	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
6	640	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
7	641, 639	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S	S
8	661, 662, 664, 670, 713, 642, 645	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S
9	666, 663	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
10	633	S	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
11	622, 623	R	S	R	R	S	S	S	S	S	S	S
12	621	R	S	S	R	R	S	S	S	S	S	S
13	643	R	S	R	S	R	S	S	S	S	S	S
14	639	R	S	R	S	R	S	S	R	S	S	S

*, ¹: perfiles comunes.

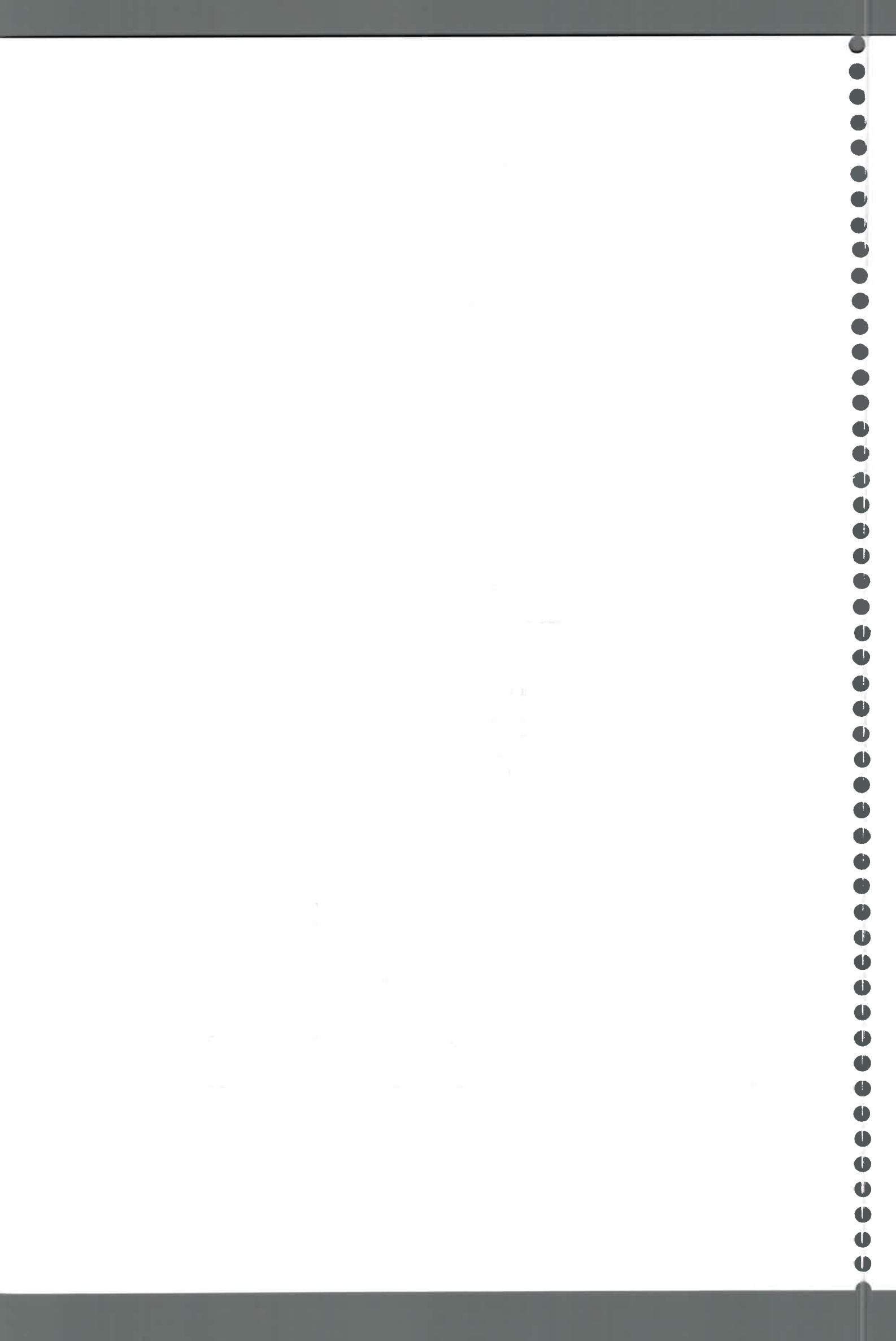


Tabla 15: Porcentaje de resistencia a antibióticos en cepas de *S. aureus* aisladas de huéspedes bovinos y humanos.

Antibiótico	N° de cepas / Porcentaje						Total (n=169)	
	Cepas humanas				Cepas bovinas (n=99)			
	Portadores sanos (n=21)		Casos clínicos (n= 49)					
Penicilina G	17	80%	35	71%	26	26%	77	45%
Ampicilina	12	57%	27	55%	4	4%	45	27%
Estreptomicina	2	9%	15	31%	26	26%	43	25%
Eritromicina	5	24%	18	41%	4	4%	29	17%
Tetraciclina	3	14%	18	37%	5	5%	24	14%
Oxacilina	4	19%	10	20%	0	0%	14	8%
Kanamicina	3	14%	11	22%	ND	ND	14	8%
Novobiocina	0	0%	11	22%	ND	ND	13	8%
Cefalotina	0	0%	1	2%	0	0%	1	0.5%
Vancomicina	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
Espiramicina	ND	ND	ND	ND	5	5%	5	3%
Gentamicina	ND	ND	ND	ND	0	0%	0	0%

Las Figuras 11 y 12 muestran los porcentajes de resistencia en cepas aisladas de huéspedes humanos. Puede observarse que los mayores porcentajes de resistencia fueron para penicilina; siendo penicilina y ampicilina mayores en cepas aisladas de portadores sanos.



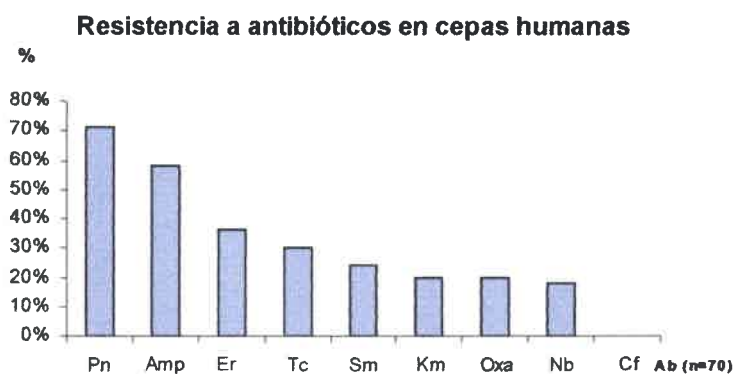


Figura 11: Porcentajes de resistencia a los antibióticos ensayados en cepas de *S. aureus* aisladas de huéspedes humanos (n=70).

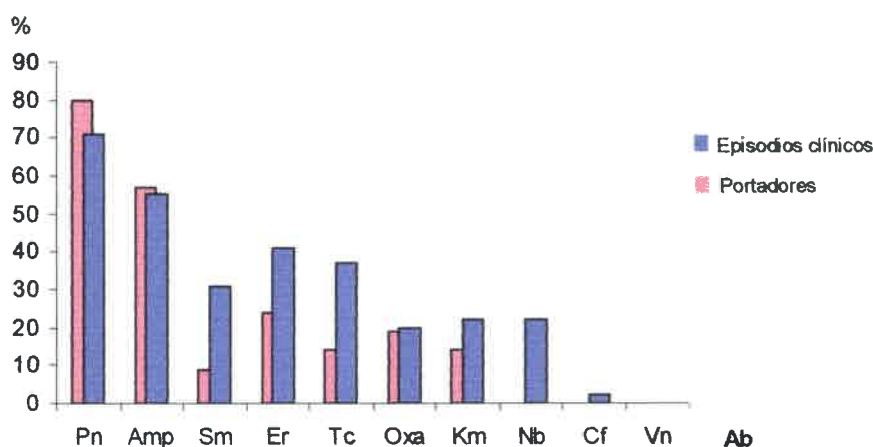


Figura 12: Porcentajes de resistencia en cepas aisladas de cepas de *S. aureus* portadores sanos (n=21) y de episodios clínicos (n=49).

En la Tabla 16 se muestran los perfiles de resistencia a antibióticos y su relación con los biotipos prevalentes (humano y NE4) y el sitio de infección en cepas aisladas de episodios clínicos. Resulta de interés destacar que las cepas pertenecientes al ecotipo humano y biotipo NE4 fueron las que presentaron resistencia a varios antibióticos; entre 2 y 8 y que las cepas aisladas de piel presentaron los mayores porcentajes de resistencia a penicilina, eritromicina y ampicilina. El 96% de las cepas pertenecientes a los biotipos mencionados (ecotipo humano y biotipo NE4) fueron resistentes a penicilina.

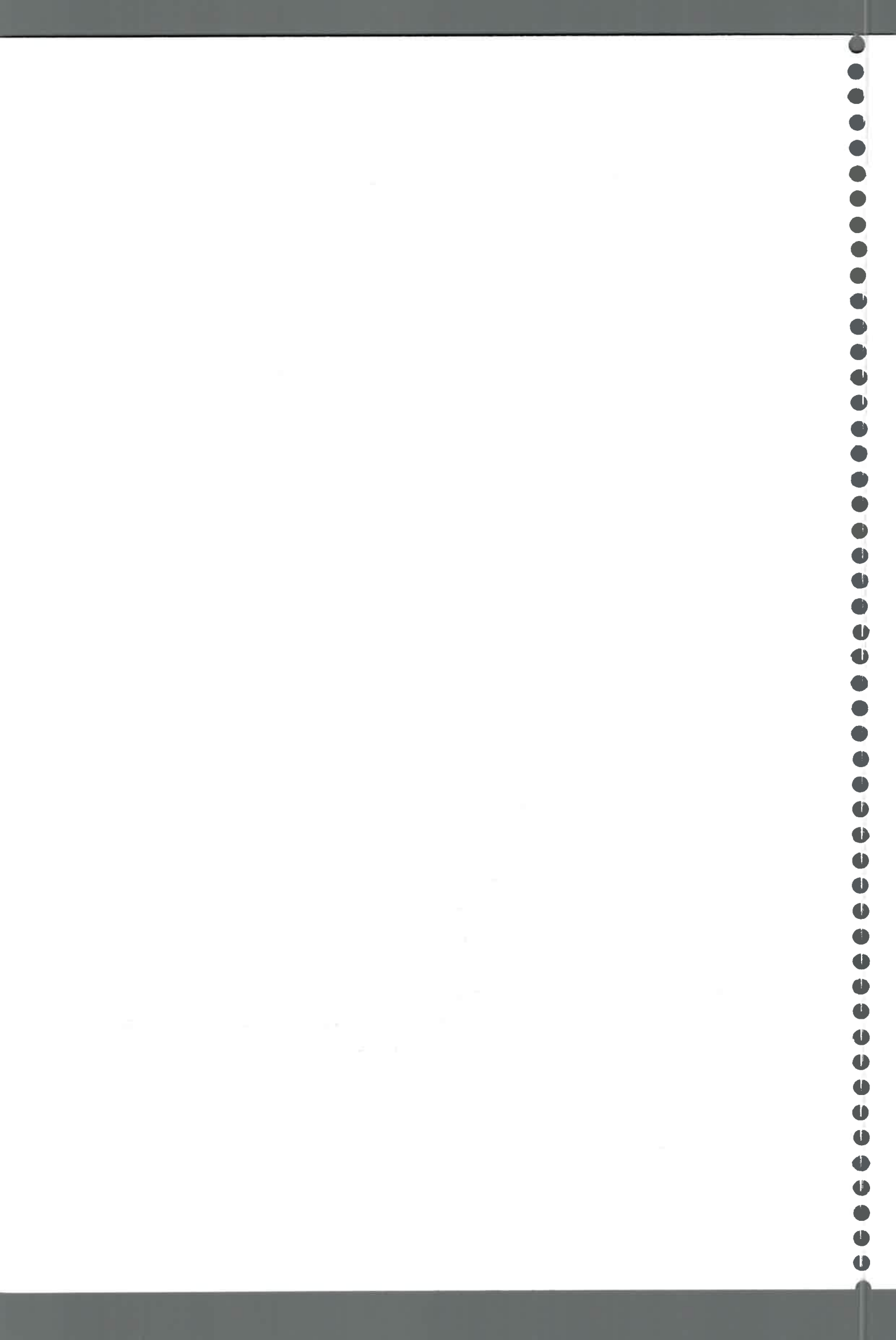


Tabla 16: Perfiles de resistencia a antibióticos en cepas de *S. aureus* pertenecientes a los biotipos humano y NE4 y su relación con el sitio de infección.

BIOTIPO	N° cepa	Sitio de infección	Resistencia a antibióticos
Humano	543	Hemo	Amp
	532	Hemo	Pn-Er-Amp-Sm-Tc-Km-Cf-Oxa
	537	Piel	Pn-Sm-Amp-Oxa
	550	Piel	Pn-Sm-Tc-Amp
	513	Piel	Pn-Sm-Tc
	550	Piel	Pn-Sm-Tc-Amp
	522	Material respiratorio	Pn-Em-Sm
	536	Herida quirúrgica	Pn-Sm-Tc-Nb-Amp
	535	Herida quirúrgica	Pn-Amp
	528	Herida quirúrgica	Pn-Kn-Oxa
	533	Secreción ocular	Susceptible
	534	Catéter	Pn-Amp
	541	Catéter	Pn-Em-Sm-Tc-Km-Amp
	551	Catéter	Pn-Tc
	532-1	Hemocultivo	Pn-Em-Sm-Tc-Km-Am-Oxa
	531	Hemocultivo	Pn-Em-Sm-Amp
NE4	511	Piel	Pn-Em-Sm-Nb-Amp
	538	Piel	Pn-Em-Tc-Km
	549	Piel	Pn-Amp
	536	Herida quirúrgica	Em-Sm-Tc-Nb-Amp
	518	Herida quirúrgica	Pn-Sm-Amp
	539	Material respiratorio	Pn-Nb-Amp
	554	Osteomielitis	Pn-Tc-Amp
	544	Catéter	Tc
	529	Catéter	Pn-Em-Nb
	545	Orina	Pn-Tc-Amp
	552	Orina	Susceptible
	540	Hemocultivo	Em-Tc



La Figura 13 muestra los porcentajes de resistencia en cepas aisladas de huéspedes bovinos. Dichas cepas mostraron los menores porcentajes de resistencia comparadas con las cepas aisladas de huéspedes humanos. Los mayores porcentajes de resistencia se observaron para penicilina (26%) y estreptomicina (20%). No se observaron resistencias para gentamicina, cefalotina ni vancomicina (Tabla 15). Solamente una cepa mostró resistencia a 4 antibióticos.

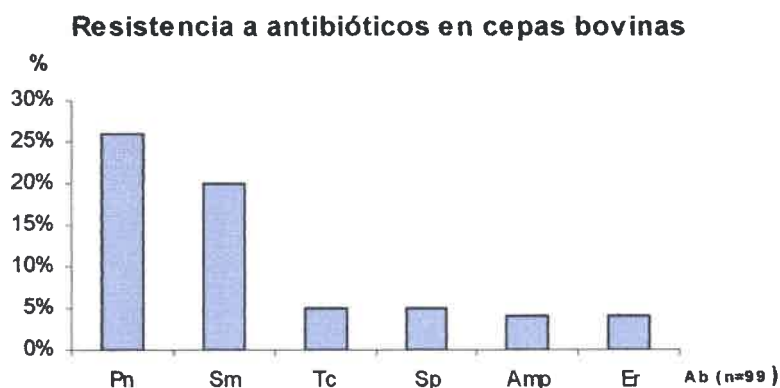


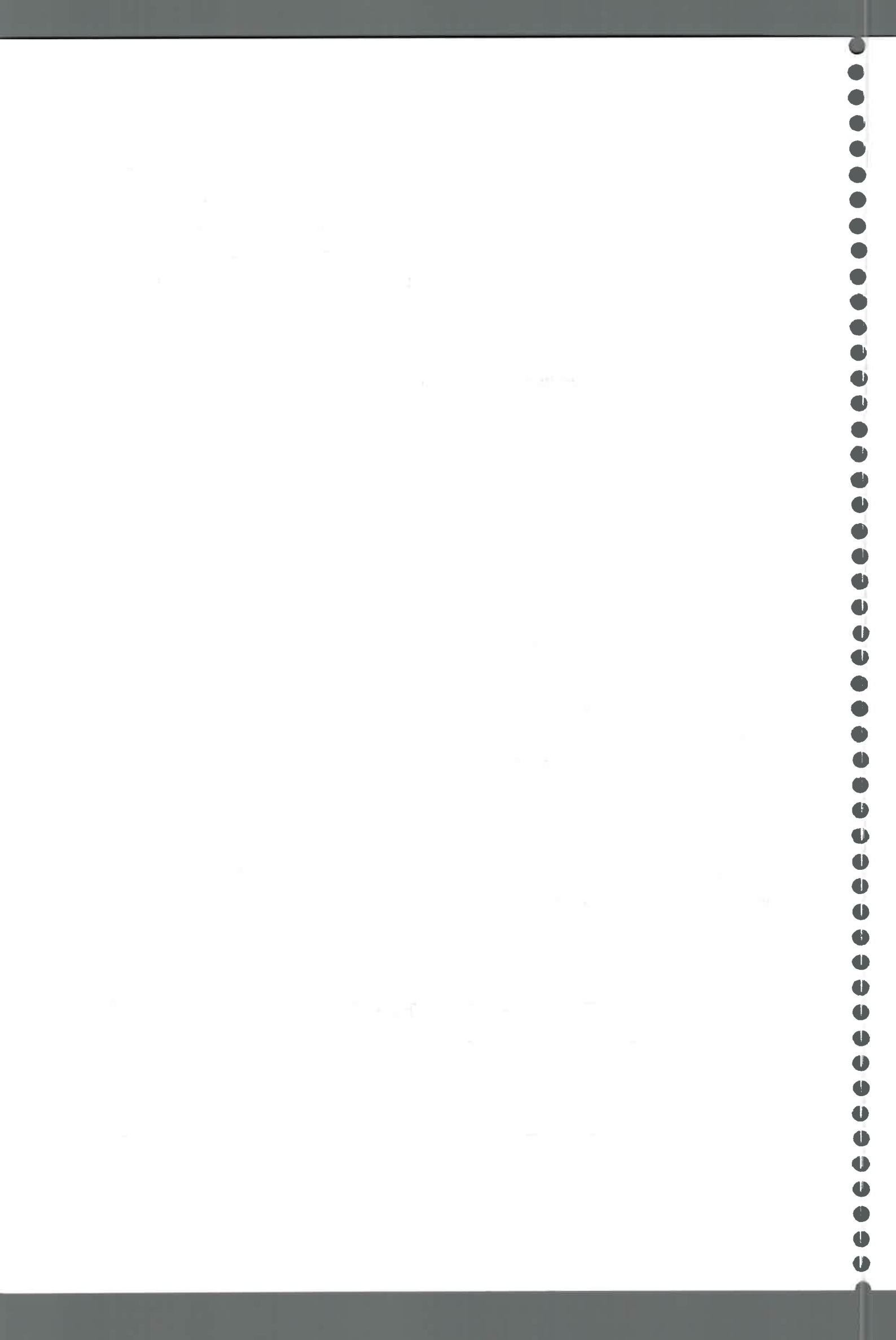
Figura 13: Porcentajes de resistencia a antibióticos en cepas aisladas de huéspedes bovinos (n=99).

Del análisis de las 58 cepas aisladas de bovinos ecotipo específico (46 pertenecientes al ecotipo bovino y 12 perteneciente al ecotipo humano) no se encontró relación entre los ecotipos prevalentes con el perfil de resistencia a antibióticos.

Es interesante destacar que el 12% del total de las cepas (n=212) presenta resistencia a meticilina, siendo los mayores porcentajes para las cepas de origen humano (20%) y alimentos (12%). No se encontraron cepas MRSA en los aislados bovinos. Los resultados se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17: Porcentaje de cepas de *S. aureus* resistentes a meticilina.

CEPAS	HUMANAS CLINICAS		HUMANAS SANAS		BOVINAS		ALIMENTOS		TOTAL	
SENSIBLES	39	80%	17	80%	99	100%	37	88%	186	88%
RESISTENTES	10	20%	4	20%	0	0%	6	12%	26	12%
TOTAL	49		21		99		43		212	



c) Extracción de ADN de plásmidos de *S. aureus*

Se determinó la presencia de ADN plasmídico en las cepas de *S. aureus* con el fin de relacionar los perfiles de plásmidos con la resistencia a antibióticos. Para la extracción de plásmidos en cepas de *S. aureus* se ensayaron tres técnicas que se detallan en la sección de Métodos. Los mejores resultados se obtuvieron con la técnica descrita por Takahashi y Nagano (1984).

Las técnicas fueron realizadas con cepas aisladas de huéspedes bovinos, utilizando como control la cepa de *S. aureus* RC105.

Al realizar las técnicas detalladas anteriormente, se observó una lisis incompleta de las células. Para completar la lisis fue necesario agregar 6 μ l de una solución de lisostafina más concentrada, por lo que se usó una concentración de 10 mg/ml. En las figuras 14 y 15 se muestran los perfiles de plásmidos obtenidos con las diferentes técnicas.

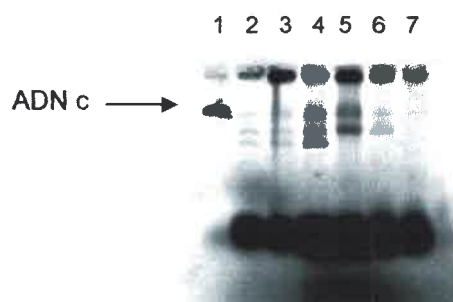


Figura 14: Perfiles de plásmidos obtenidos según las distintas técnicas. Calle 1: ADN cromosomal de *S. aureus* aislado de una cepa bovina, calles 2 - 4: técnica Takahashi-Nagano, calles 5 - 6: técnica Birboim y Dolly modificado, calle 7 técnica ii según Métodos.

La técnica de extracción de plásmidos de Takahashi-Nagano fue la que arrojó los mejores resultados. Aunque la técnica es rápida y fácil de realizar y según la bibliografía pueden detectarse plásmidos de bajo y alto peso molecular entre 2,0 a 122×10^6 D, no pudieron ser extraídos la mayoría de los plásmidos de las cepas ensayadas (Takahashi y Nagano, 1984).

Se realizó la extracción al 20% de las cepas, incluyendo cepas aisladas de huéspedes humanos y bovinos). Se pudo aislar plásmidos en el 10% de las cepas humanas y en el 23% de las cepas bovinas. El mayor número de plásmidos diferentes encontrados en una cepa fue de 2 (Figura 15).

1000

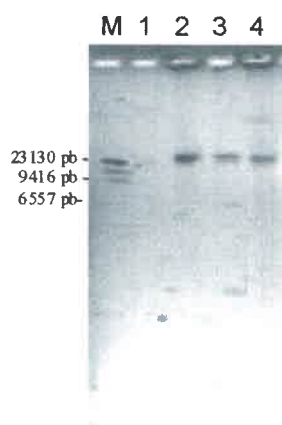


Figura 15: Perfiles plasmídicos de cepas de *S. aureus* ensayadas por la técnica de Takahashi y Nagano. M: marcador de peso molecular.

Las cepas que no mostraron plásmidos o cuyas bandas plásmídicas fueron tenues, se trataron con cloranfenicol para intentar aumentar el número de copias. Los resultados mostraron que no fue posible obtener bandas de mayor intensidad.

3-CARACTERIZACION DE CEPAS DE *S. aureus*: TÉCNICAS MOLECULARES

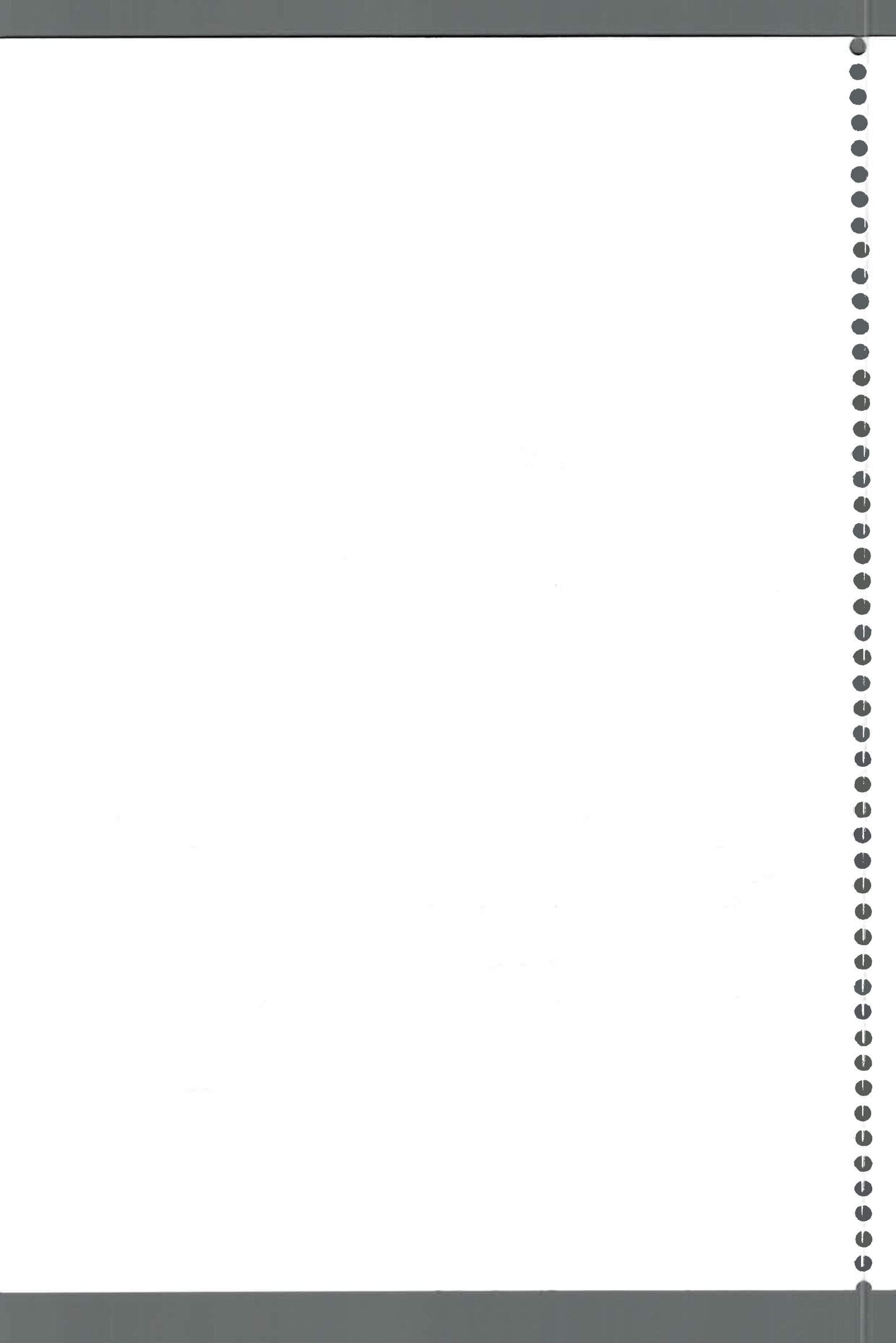
b) Optimización de la técnica de RAPD-PCR

La optimización de la técnica de RAPD-PCR se llevó a cabo realizando distintas modificaciones a la técnica descrita por Williams y col. (1990). La puesta a punto del método se ensayó con ADN de muestras aisladas de casos clínicos en humanos con el cebador P6.

Se consideraron los siguientes parámetros:

i) Extracción y pureza del ADN cromosomal

El ADN bacteriano puede ser aislado de bacterias de una variedad de técnicas establecidas. Para la reproducibilidad de la técnica es importante que el ADN sea de alta pureza, libre de sustancias contaminantes que puedan inhibir la reacción de amplificación y libre de ADNsas, que pueden degradar el ADN influenciando el resultado de la reacción. Por



lo tanto el ADN debe ser aislado a partir de un método seguro y confiable (Caetano-Annoles y Gresshoff, 1998).

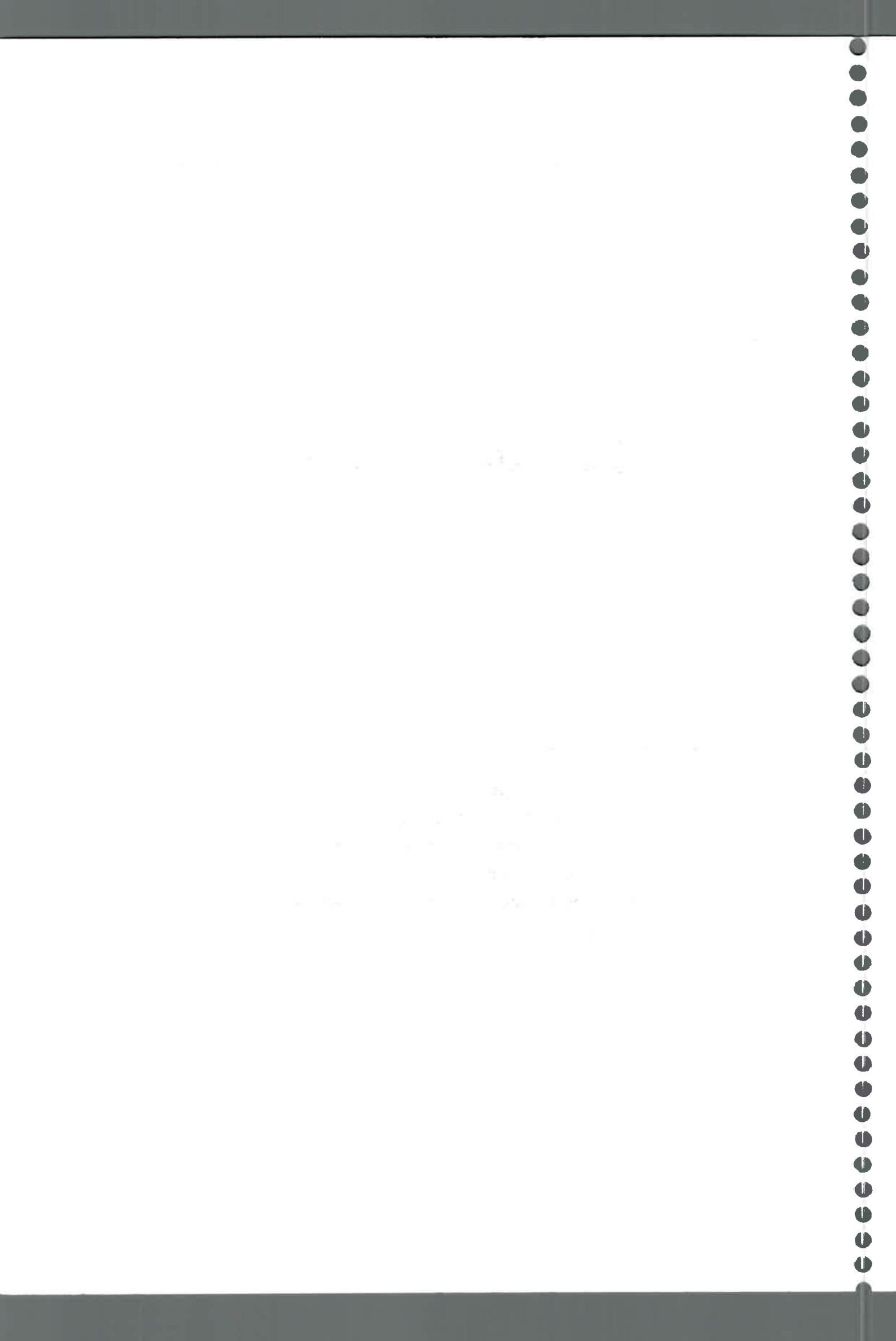
Para lograr la obtención de un ADN de alta pureza, libre de sustancias contaminantes como proteasas, ADNsas, etc. que pueden inhibir la reacción de amplificación, se realizaron algunas modificaciones al protocolo de extracción. Entre ellas, se cambió el paso de extracción con fenol-cloroformo por cloroformo, ya que el fenol es un inhibidor de la enzima ADN *Taq* polimerasa. La Figura 16 muestra los ADN cromosomales extraídos según el protocolo anteriormente descrito.



Figura 16: Extracción de ADN cromosomal de cepas de *S. aureus* según el protocolo descrito en Métodos.

ii) Concentración de ADN cromosomal

La variable más importante para asegurar la reproducibilidad de los resultados es la concentración de ADN. Se ensayaron distintas concentraciones de ADN por cepa (20, 40 y 100 ng.). La concentración que se determinó óptima para las reacciones de amplificación, fue entre 25 y 50 ng por reacción. También se determinó que a concentraciones menores de 25 ng la técnica pierde reproducibilidad, pero a concentraciones mayores el patrón de bandas se conserva (Figura 17).



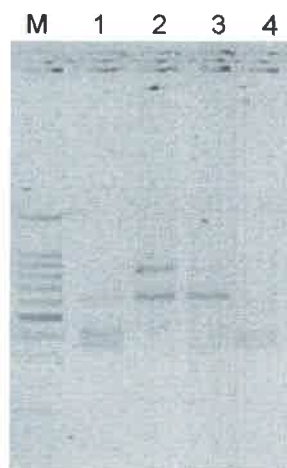


Figura 17: Productos de amplificación de cepas de *S. aureus* ensayadas por RAPD-PCR a distintas concentraciones de ADN. M: marcador de peso molecular de 100 pb; calles 1 a 4: ADN de cepa 514 con 10, 20, 40 y 100 ng., respectivamente.

iii) Concentración de reactivos

Se analizaron distintas concentraciones de Cl_2Mg (1,5, 3, 3,5 y 4,5 mM), cebador (2, 3 y 3,5 μM), dNTP (200 μM) y enzima ADN *Taq* polimerasa (1 IU y 2 IU). Además se realizaron ensayos con distintas marcas de enzima ADN *Taq* polimerasa (Pharmacia y Promega) y se realizaron ensayos con y sin aceite mineral.

Se mantuvo la concentración de dNTPs constante a 200 μM y se fue variando gradualmente la concentración de Cl_2Mg de 1,5 mM a 3,5 mM. A medida que se aumentaba la concentración, los productos comenzaron a adquirir mayor intensidad y las bandas inespecíficas desaparecieron. No se varió la concentración de dNTP, porque la mayoría de los protocolos sugieren que la concentración óptima es 200 μM y además un incremento en la concentración de dNTPs requiere un incremento en la concentración de iones Mg^+ para que la reacción sea óptima (Caetano-Annoles y Gresshoff, 1998). Se determinó que a concentraciones mayores de 3,5 mM de Cl_2Mg la reacción se inhibía (Figura 18).



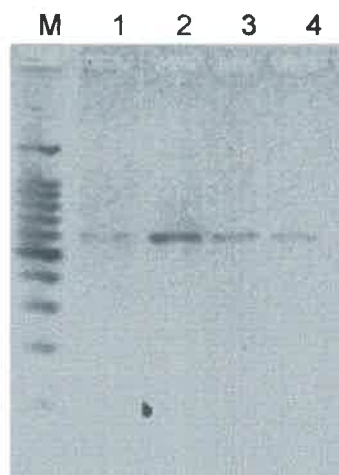


Figura 18: Productos de amplificación de cepas de *S. aureus* ensayadas por RAPD-PCR a distintas concentraciones de Cl_2Mg . M: marcador de peso molecular de 100 pb; Calles 1 a 4: cepa 520 con 5, 3, 2 y 1,5 mM de Cl_2Mg , respectivamente.

Se ensayaron dos concentraciones de cebador (2 y 3 μM). Para que la reacción sea óptima se sugiere que debe estar en exceso y debe visualizarse en los geles junto al frente de corrida. Se determinó que la concentración adecuada de cebador fue de 3 μM .

También se ensayaron distintas concentraciones de ADN *Taq* polimerasa (1, 2 y 3 IU), a concentraciones menores de 2 IU hubo poco producto amplificado y a concentraciones mayores de 2 IU resultó en un aumento de la inespecificidad (Figura 19).

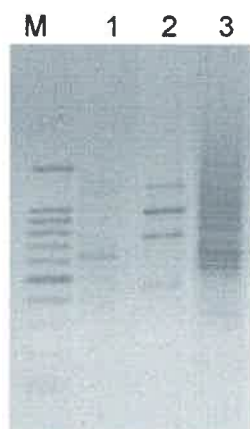
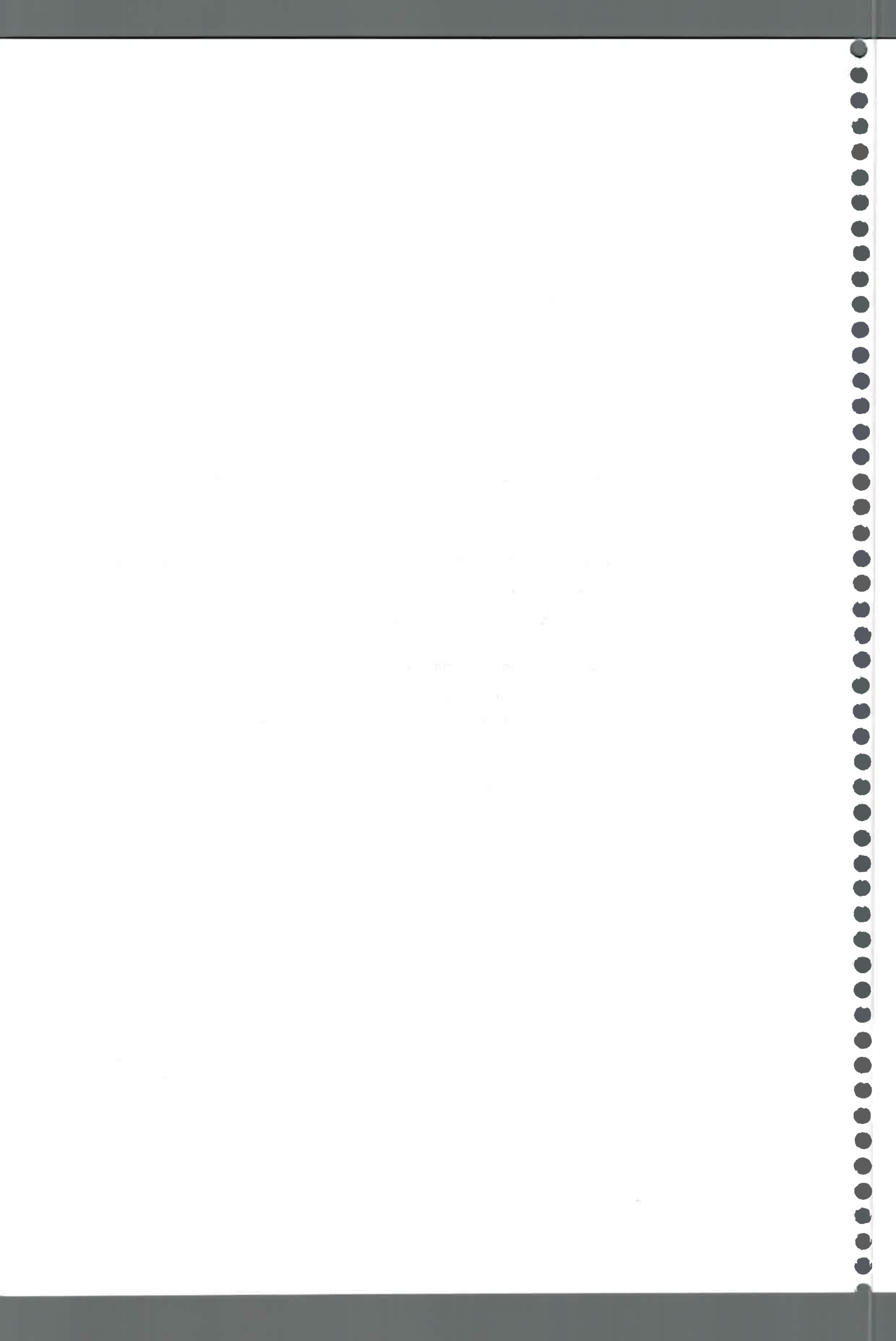


Figura 19: Productos de amplificación de cepas de *S. aureus* ensayadas por RAPD-PCR a distintas concentraciones de ADN *Taq* Polimerasa. M: marcador de peso molecular; Calles 1 a 3: Cepa 520 con 1, 2 y 3 IU de ADN *Taq* Polimerasa.



Los protocolos de PCR de Promega proponen como condiciones óptimas 200 μM de dNTP, 0,4 μM de cada de cebador, 1,5 mM de Cl_2Mg y 2 IU μl de ADN *Taq* polimerasa, sin embargo en las condiciones realizadas en el laboratorio se determinó que la concentración óptima de reactivos para la reacción de PCR fue: 3,5 mM Cl_2Mg , 3 μM de cebador, 200 μM de cada dNTP (Promega) y 2 IU de *Taq* Polimerasa (Promega) y con el agregado de aceite mineral para evitar la evaporación de los reactivos durante el ciclado.

iv) Ciclo térmico de amplificación

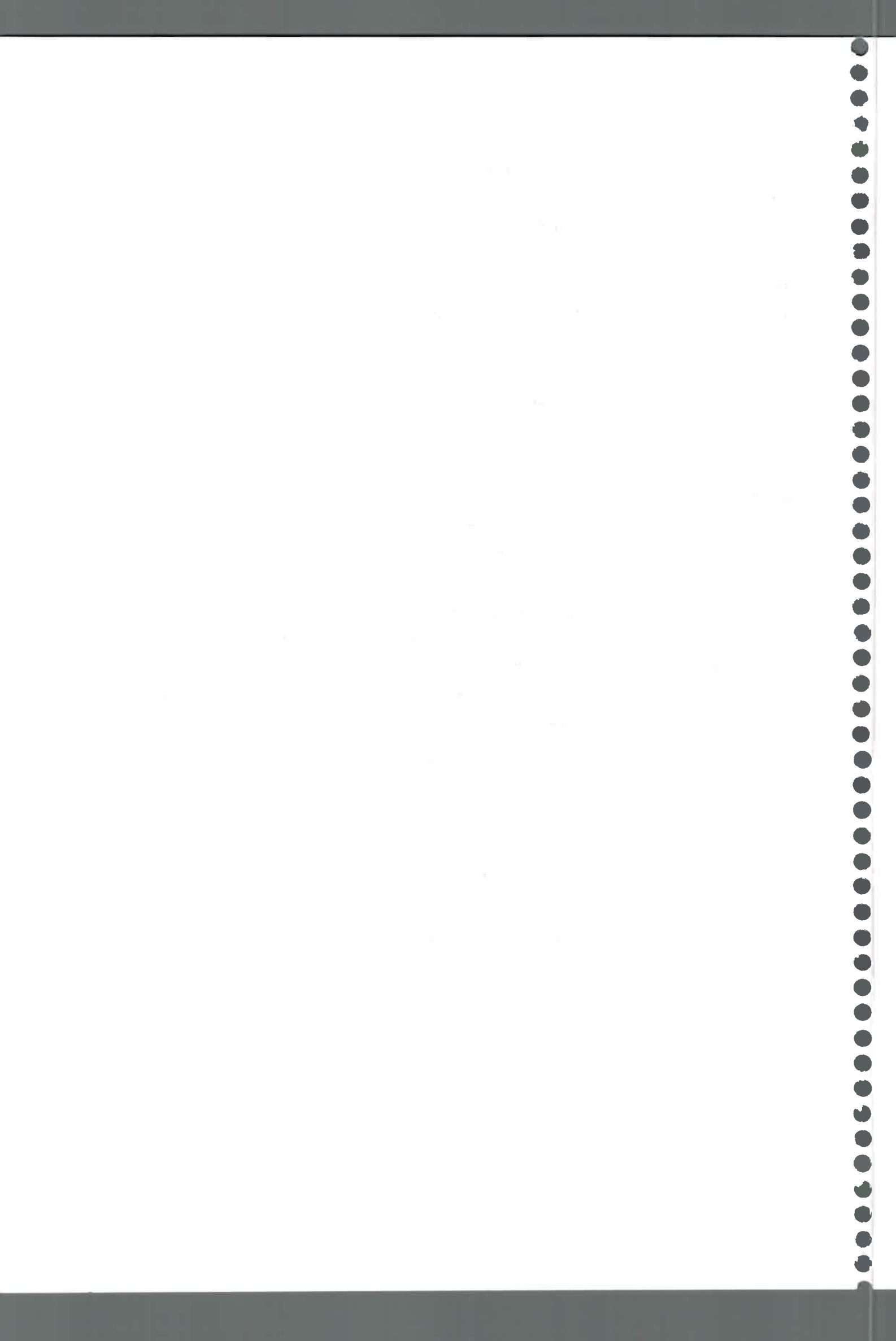
Se ensayaron varios programas a distintas temperaturas de hibridación (30° C y 37° C) evitando fragmentos de amplificación inespecíficos para que la reacción de PCR sea óptima.

Se trabajó con un primer paso de desnaturalización inicial de 95° C, previo al ciclado. La bibliografía recomienda un último paso de extensión de reacción a 72° C, debido a que, la actividad de la enzima puede no ser óptima durante la reacción. En este último paso la enzima ayudaría a finalizar la elongación de la mayoría de los productos iniciados en el último ciclo. En las condiciones empleadas en el laboratorio se determinó que el tiempo de extensión adecuado fue de 8 min a 72°C.

En las condiciones empleadas en el laboratorio se determinaron las siguientes condiciones del ciclo: un paso de desnaturalización de 94°C 5 min y 40 ciclos de amplificación (93° C 1 min, 37°C 1:30 min, 72°C 1:30 min), con un paso de final de extensión de 8 min a 72° C.

v) Estandarización en la preparación de los geles

Se determinaron las condiciones óptimas de corrida: volumen y concentración de agarosa, volumen de siembra de los productos de amplificación, voltaje constante y tiempo de corrida. Esta estandarización resulta esencial en el análisis comparativo de varios geles, dado que los mejores resultados se obtienen cuando todos los parámetros mencionados están estandarizados de manera tal que las fotos presentan perfiles de bandas comparables entre sí al analizarlas en los softwares correspondientes.



Los parámetros establecidos en el laboratorio fueron: agarosa 1,5 en TAE, 80 ml con 0,5 mg/ml de bromuro de etidio; 2 horas de corrida a 70 voltios, siembra de 12 μ l de volumen total de producto amplificado.

b) Optimización de la técnica de REP-PCR

La técnica de REP-PCR realizada según Del Vecchio y col. (1995), fue ligeramente modificada en el laboratorio. La puesta a punto del método se ensayó con muestras de ADN aisladas de casos clínicos usando como cebador la secuencia RW3A 5' TCGCTCAAAACAACGACACC 3', cuya secuencia es homóloga a REP-MP-13 de *Mycoplasma pneumoniae*.

Los pasos modificados fueron idénticos a los establecidos para RAPD-PCR, excepto:

i) La temperatura de hibridación. El cálculo teórico fue de 52° C, dado que el cebador es de 20 pb y tiene un 50% de CG. Se compararon reacciones de REP-PCR a dos temperaturas de hibridación, 47° C y 54° C. Como los productos a obtener debían ser de 250 a 4000 pb, se determinó la temperatura donde se obtuvieran los productos de amplificación de mayor peso molecular. Los mejores resultados fueron obtenidos con una temperatura de hibridación de 54° C. A 47° C los productos fueron menores de 1000 pb (Figura 20).

ii) Se agregó dimetil-sulfóxido (DMSO) al 2,5% para estabilizar la reacción. Se observó que el agregado no influyó en los patrones de bandas obtenidas. En la bibliografía se informa que la adición de DMSO, resulta en un aumento de la intensidad del producto amplificado al trabajar con concentraciones de ADN menores a 1 μ g.

En el laboratorio se determinaron las siguientes condiciones para el ciclo térmico de amplificación: un paso de desnaturalización de 94° C, seguido por 36 ciclos de 1 min a 93° C, 1:30 min a 54° C, 1:30 min a 72° C. El programa finalizó con un paso de extensión de 8 min a 72° C.

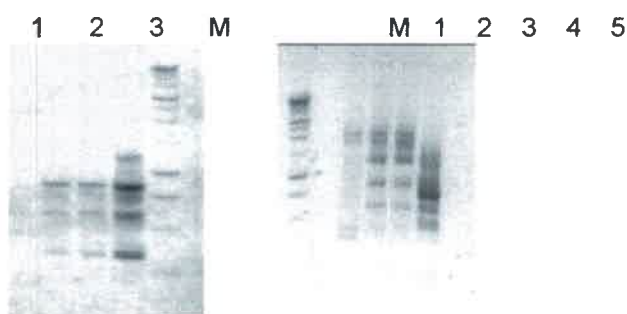


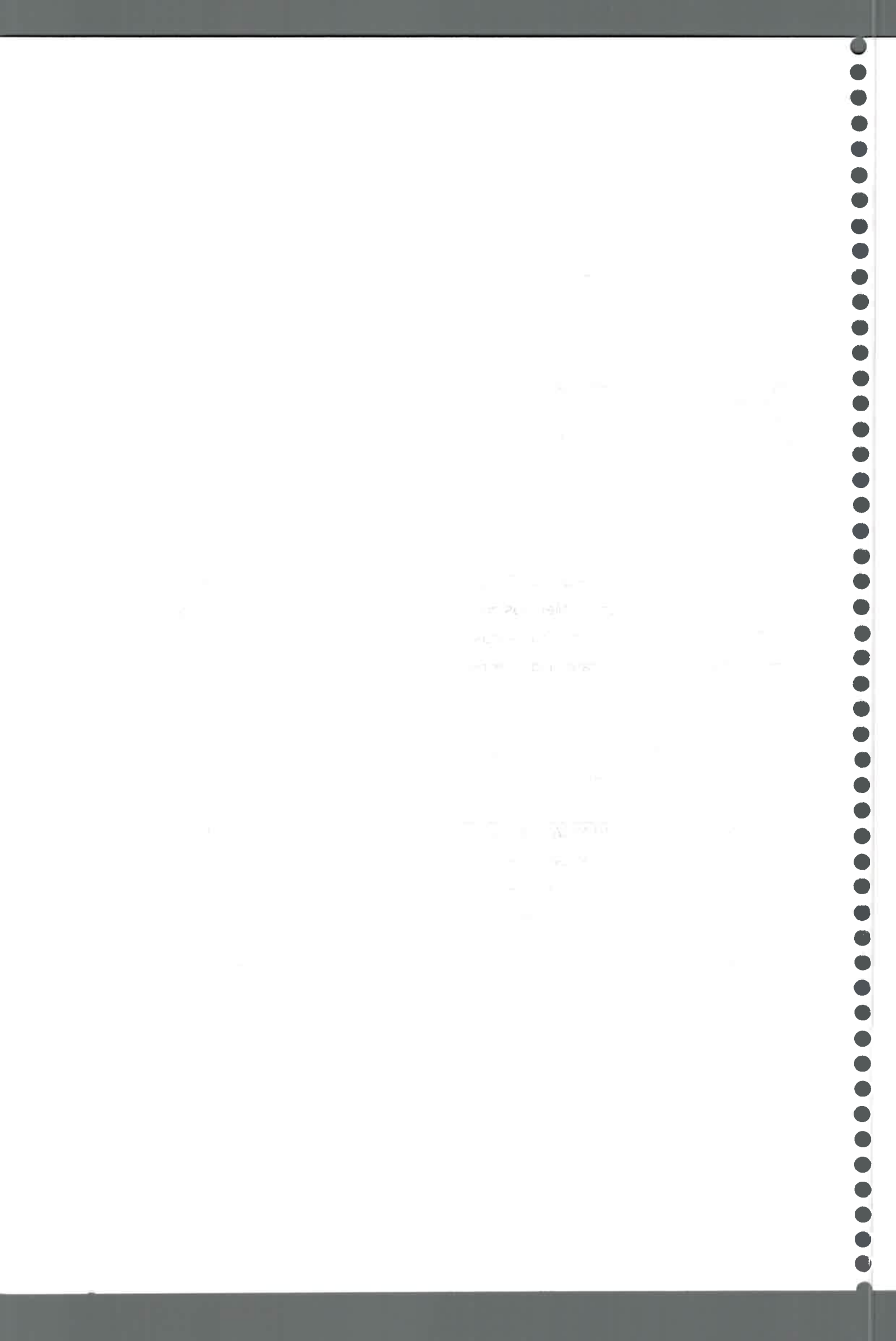
Figura 20: Productos de amplificación de cepas de *S. aureus* ensayadas por REP-PCR a dos temperaturas de anelining. Foto a: Cepa 520 ensayada a 47°C, calle 1 sin agregado de DMSO, calle 2 y 3 con agregado de DMSO. Foto b: Cepas 511 (calle 1 y 2) y 520 (calle 3 y 4), sin agregado de DMSO ensayadas a 54° C. M= marcador de peso molecular de 1 kb.

c) Análisis de las cepas por RAPD-PCR

Se ensayaron 212 cepas de *S. aureus* por RAPD-PCR provenientes de diferentes orígenes según se explicó en Métodos con los cebadores OLP6, OLP11, OLP13 y OLP14. La Tabla 16 muestra las características de cada cebador utilizado y el número de fragmentos obtenidos con cada uno de ellos.

Tabla 18: Cebadores ensayados para el análisis de cepas de *S. aureus* de distintos orígenes mediante la técnica de RAPD-PCR.

CEBADOR	SECUENCIA	5' – 3'	% GC	Nº FRAGMENTOS
P6	GAGGGAAGAG		70%	1 – 13
P11	ACGATGAGCC		60%	1 – 11
P13	ACGATGAGCC		60%	1 – 11
P14	ACCACCCACC		60%	1 – 9



En este trabajo se probaron los 4 cebadores, se analizó el número de fragmentos generados y se decidió trabajar con 3. Se utilizaron los cebadores OLP6, OLP11 y OLP13, que fueron elegidos debido a que generaron un alto número de bandas y un número limitado de bandas de baja intensidad. El conjunto de bandas producidas por un cebador fue definido como "perfil genotípico". Los aislados fueron ensayados dos veces y cada ensayo realizado fue reproducible.

El análisis de todas las cepas con los cuatro *cebadores* ensayados mostró perfiles de bandas con un peso molecular comprendido entre 350 y 1800 pb.

El análisis de las cepas humanas aisladas de casos clínicos con los cuatro *cebadores* ensayados mostró los siguientes porcentajes de bandas compartidas:

Con el *cebador* P6 el 58% de las cepas compartieron la banda de 1600, el 53% la bandas de 1700 pb y el 46% las de 1100 y 900 pb. Con el *cebador* P11 el 81% de las cepas compartieron la banda de 900 pb y el 74% las de 700 y 500 pb. Con el *cebador* P13 el 67% compartieron la banda de 1700, el 65% la banda de 1800 pb y el 58% la banda de 400 pb. Con el *cebador* P14 el 92% de las cepas humanas compartieron la banda de 350 pb, el 85% la de 1000 pb y el 70% la de 900 pb. Se obtuvieron 36, 33 y 35 perfiles con los cebadores P6, P11 y P13, respectivamente.

Para las cepas bovinas los porcentajes de bandas compartidas fueron:

Con el *cebador* P6, el 37% de las cepas compartieron la banda de 1100 pb y 900 pb y el 35% la banda de 600 pb. Con el *cebador* P11, el 42% la banda de 500 pb y el 40% la de 800 pb. Con el *cebador* P13 el 35% las bandas de 1500 y 500 pb. Con el *cebador* P14, el 90% la banda de 600 pb y el 60% la banda de 700 pb. Se obtuvieron 35, 18 y 36 perfiles con los cebadores P6, P11 y P13, respectivamente.

El índice de Hunter-Gaston es una estimación del poder discriminatorio de una técnica. Está determinado por un número de perfiles definidos por el método usado y la frecuencia relativa de los mismos (Hunter y Gaston, 1988).

Los valores de los índices de discriminación obtenidos se muestran en la Tabla 19. Todos los *cebadores* ensayados dieron altos índices de discriminación tanto para las cepas bovinas como para las cepas de origen humano, el *cebador* OLP6 fue el de mayor poder de discriminación.

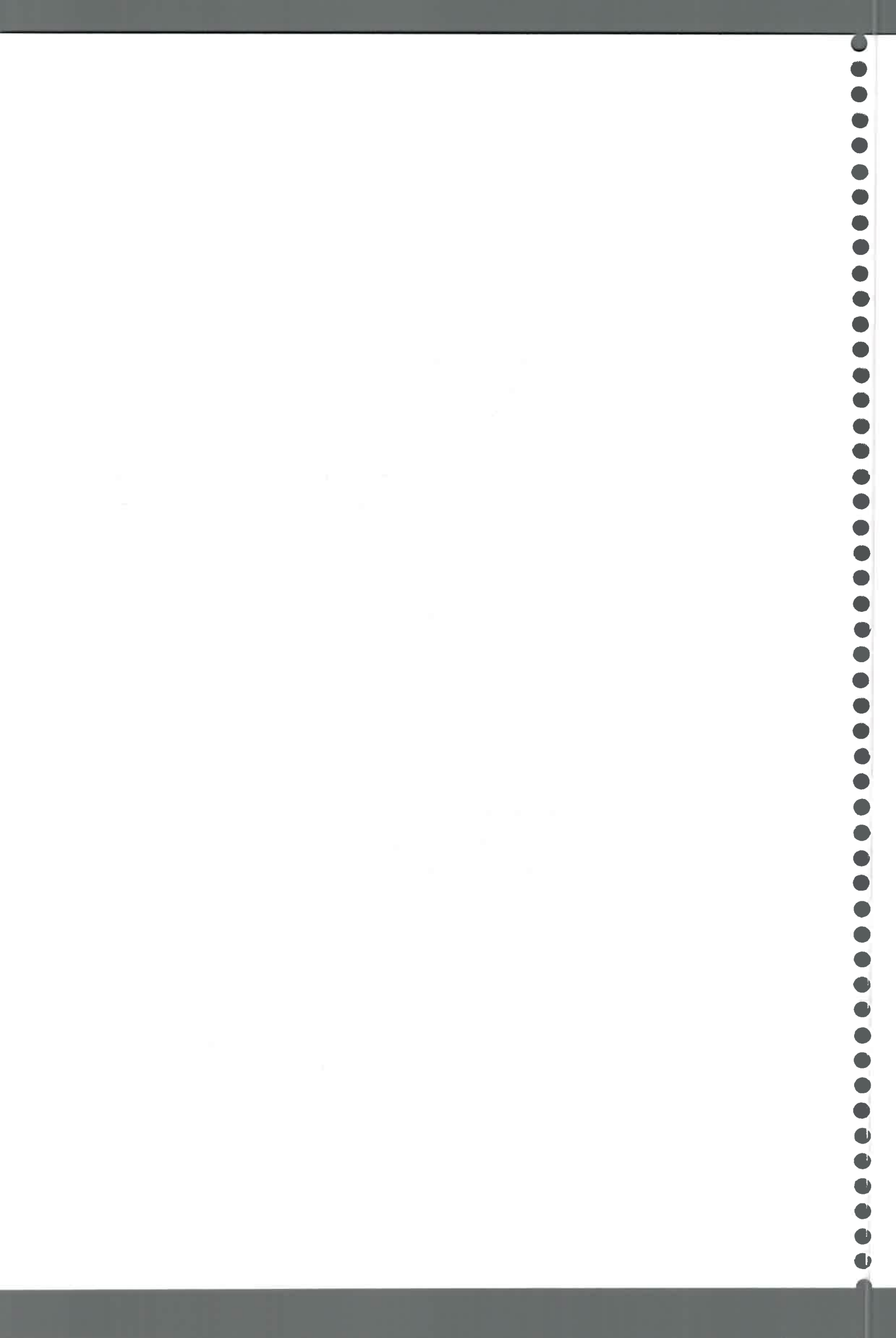


Tabla 19: Índices de discriminación de los cebadores individuales ensayados por RAPD-PCR y sus combinaciones calculados según Hunter-Gaston.

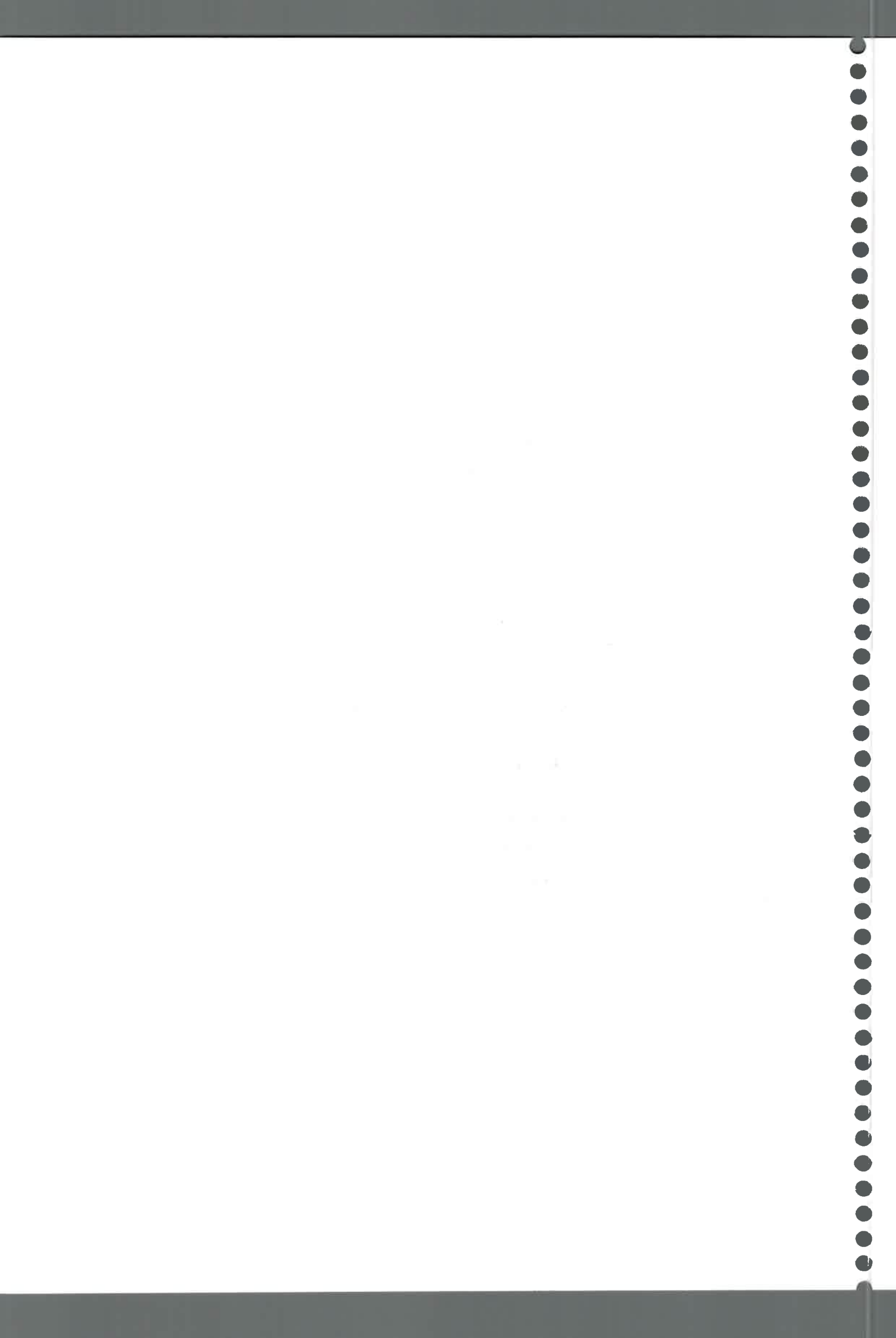
CEBADOR	CEPAS HUMANAS	CEPAS BOVINAS	CEPAS HUMANAS-BOVINAS
P6	0.996	0.993	0.987
P11	0.988	0.933	0.960
P13	0.984	0.993	0.905
P14	0.970	0.968	0.950

Estos índices son los deseables, ya que la bibliografía considera que una técnica con un índice mayor de 0.90 es de alto poder discriminatorio (Olive, 1999).

4- ANALISIS MOLECULAR DE CEPAS DE *S. aureus* POR RAPD-PCR

El análisis taxonómico molecular fue realizado con el software NT-SYS versión 3.0 según el coeficiente de Dice (S_D) y los coeficientes de correlación de agrupamiento fueron calculados según la media aritmética no ponderada (UPGMA) con ligamiento completo (Rohlf, 1993) según fue descrito en Métodos. Se realizaron los análisis del total de las cepas de *S. aureus* con los distintos *cebadores* (P6-P11-P13) por separado y para cada población.

El análisis se realizó tratando de encontrar posibles relaciones entre genotipos y biotipos, lugar de aislamiento, resistencia a antibióticos, sitio de infección, presencia de polimorfismos en los genes analizados y lugar geográfico de aislamiento. En general las cepas se agruparon de diferente manera de acuerdo al cebador ensayado. En la Figura 21 se muestran los perfiles genotípicos de las cepas aisladas de huéspedes humanos y bovinos con cada *cebador*.



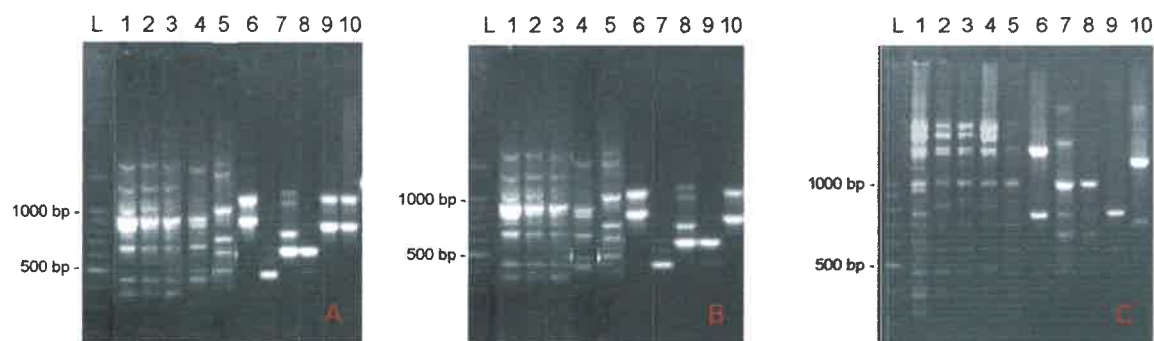


Figura 21: Perfiles genotípicos de cepas de *S. aureus* ensayadas con los distintos cebadores. Calles 1-5: cepas aisladas de huéspedes humanos, calles 6-10: cepas aisladas de huéspedes bovinos. A: Cebador OLP6. B: Cebador OLP11. C: Cebador OLP13.

Se analizaron los perfiles generados con cada *cebador* según el software NT-SYS-pc. Para el análisis de dendrogramas se consideró un primer nivel de agrupamiento a una determinada similitud genética relativa según el Coeficiente de Dice. Un segundo nivel, determinado al 80%, permitió una mayor diferenciación de las cepas y cada grupo de cepas fue considerado como un genotipo. Cada grupo de cepas (genotipo) perteneciente a un mismo cluster es considerado epidemiológicamente relacionado. En los dendrogramas se muestran las cepas con genotipos prevalentes.

a) Cepas de *S. aureus* aisladas de huéspedes humanos

- Cebador OLP6

La Figura 22 representa el dendrograma construido a partir del análisis con el cebador OLP6. En cada dendrograma se muestran las cepas aisladas de diferentes sitios.

En un primer nivel de agrupamiento, a una similitud genética relativa menor al 70% se observan 10 grupos. Las cepas se agrupan sin relación al sitio de infección producida, pero al 100% de similitud corresponden cepas aisladas de la misma región geográfica. Al segundo nivel de agrupamiento, 80%, se puede observar un genotipo prevalente formado por 9 cepas. Siete de las 12 cepas pertenecientes al cluster C tienen como perfil de resistencia Penicilina-estroptomicina.

100

100

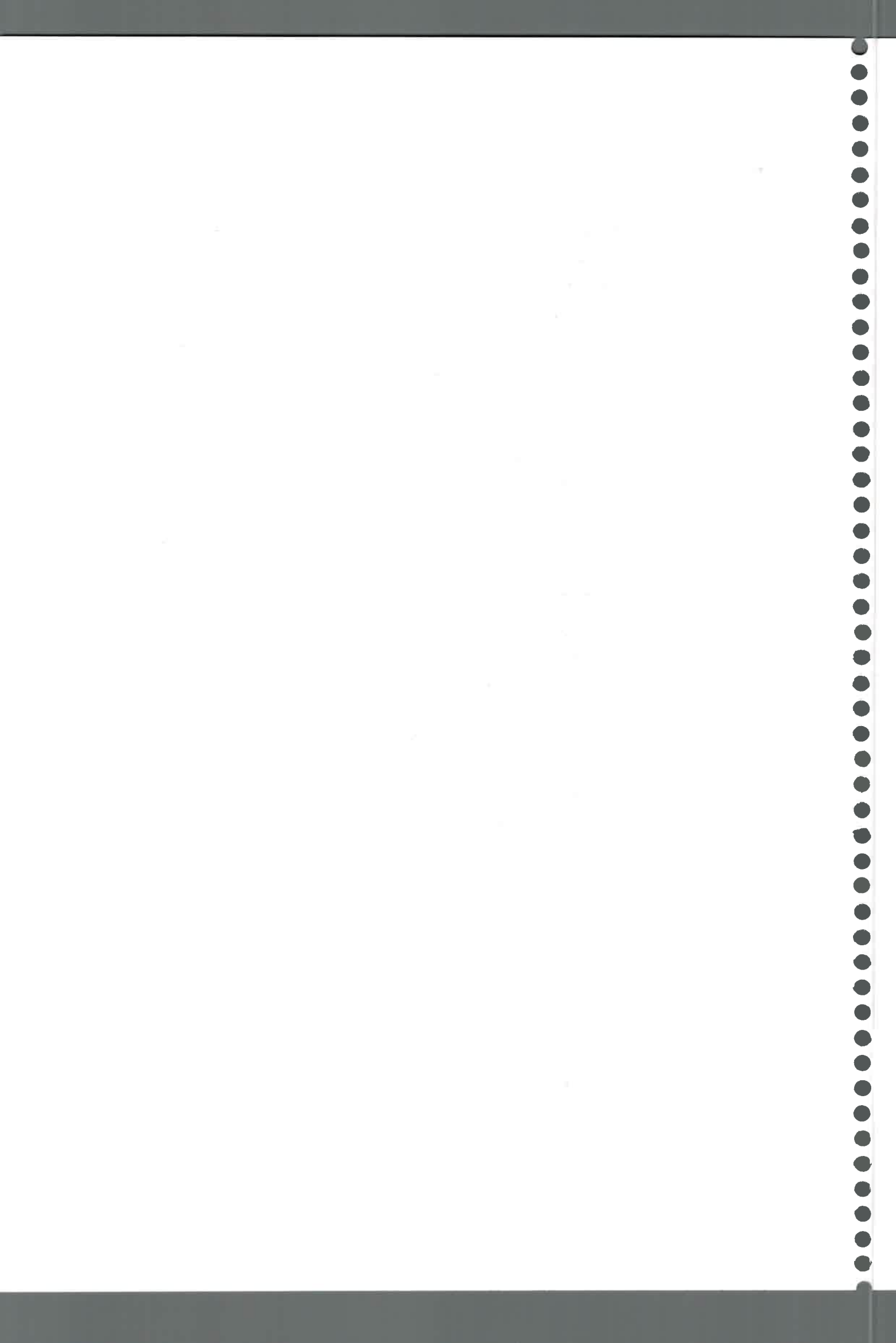


- Cebador OLP11

Las cepas ensayadas con el cebador OLP11 mostraron perfiles muy similares entre sí, aunque dichos perfiles fueron diferentes según lo observado al realizar el análisis con el cebador OLP6. Los resultados de este cebador pueden asociarse con los resultados de las pruebas realizadas (biotipificación, resistencia a antibióticos, etc). En la Figura 23, en un primer nivel de agrupamiento, al 70% de similitud se observan 3 grupos (A-C), las cepas que se ubican al 100% de similitud no tienen relación con el lugar geográfico de aislamiento, pero sí con el sitio de infección producida. El subgrupo formado por las cepas 518 y 531 provienen de infecciones de heridas quirúrgicas; el subgrupo formado por las cepas 527, 528, 541, 544, 545 y 546 provienen de infecciones en piel, catéter, orina y hemocultivos; el subgrupo formado por las cepas 519 y 526 corresponden a aislados de hemocultivos. A un segundo nivel de agrupamiento, al 80% se encuentran 3 genotipos prevalentes (indicados con líneas verdes y asterisco). Las tres cepas aisladas de osteomielitis se encuentran en el cluster A1 subgrupo III y las tres de orina en el cluster A2. El cluster A1 agrupa 9 aislados (53%) pertenecientes al ecotipo humano y el cluster A2 agrupa 6 aislados (50%) correspondientes al biotipo no-específico 4 (NE4). Las diferencias encontradas fueron estadísticamente no significativas según el test X^2 . También se observa el cluster A1-I en el cual predomina el perfil penicilina-eritromicina, en el siguiente (A1-II) predomina el perfil penicilina-ampicilina y otro (A1-III) con predominio de penicilina-tetraciclina. Las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas según el test X^2 para los perfiles penicilina-eritromicina y penicilina-ampicilina, los valores obtenidos fueron 13,9 ($p < 0,005$), 16,2 ($p < 0,005$), respectivamente y 0,121 ($p > 0,005$) para el perfil penicilina-ampicilina. Estos resultados estarían indicando la asociación entre determinados genotipos y la resistencia específica a antibióticos.

- Cebador OLP13

En la Figura 24, en un primer nivel de agrupamiento, se puede observar que al 40% de similitud hay 5 grupos (A-E). Los perfiles son diferentes a los encontrados con los otros cebadores, se agrupan sin relación al lugar y al sitio de infección. Al 100% algunos subgrupos tienen relación con el lugar de aislamiento, como 514, 517 y 538, 531.

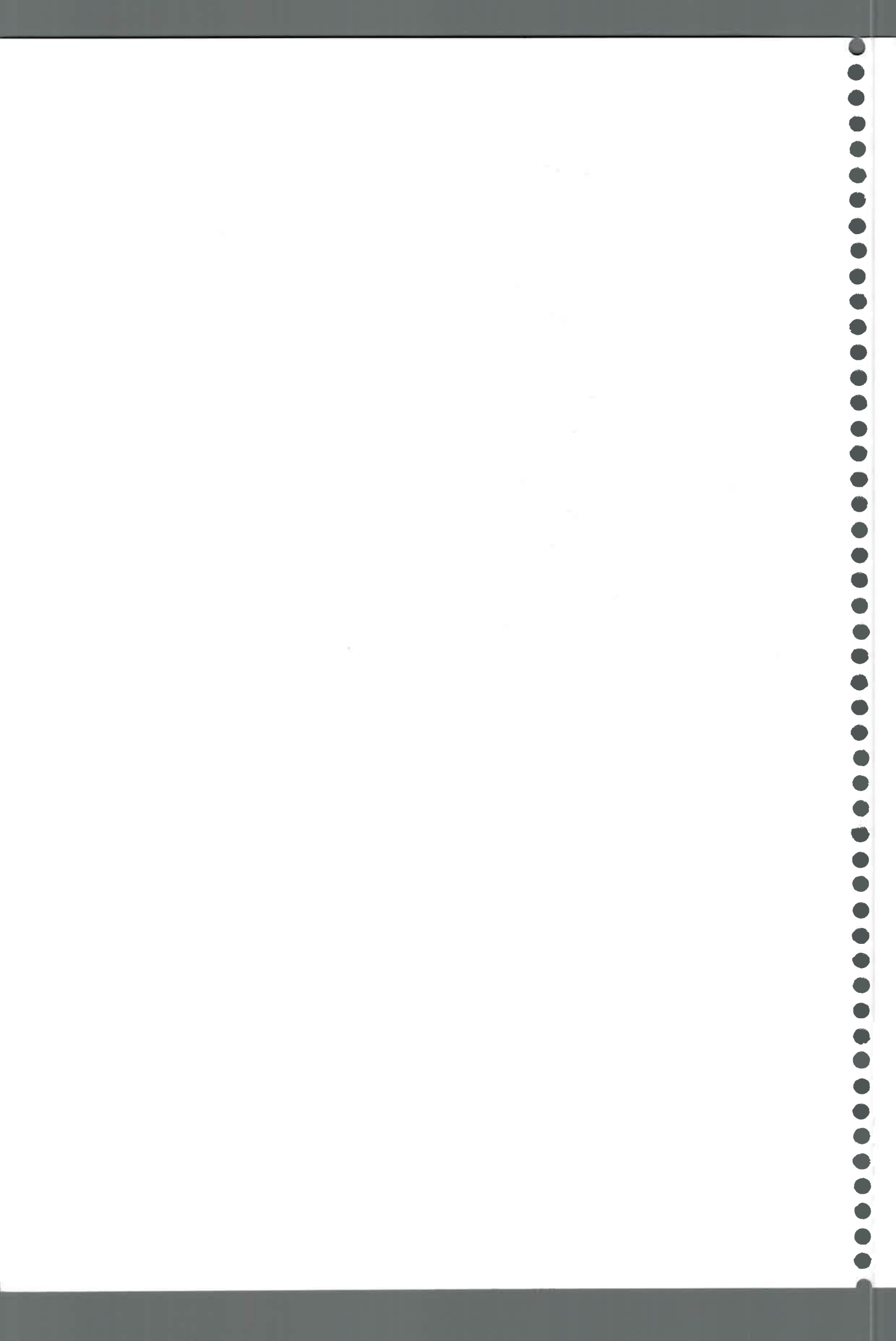


- Cebadores OLP6-OLP11-OLP13

En la Figura 25 al 60% se observan 6 grandes grupos (A-F). Las cepas se agrupan sin relación al lugar y al sitio de infección. Las cepas 545 y 546, ambas aisladas de infección urinaria, comparten el mismo genotipo al ser analizadas con los tres cebadores, ya que tienen el mismo perfil según los cebadores OLP11 y OLP13 y fueron aisladas del mismo lugar geográfico.

En el cluster B, donde se ubican la mayoría de los aislados (57%) se encuentran 9 cepas pertenecientes al biotipo NE4 y 8 pertenecientes al ecotipo humano. En este cluster también se observa una asociación entre el perfil penicilina-ampicilina (56%). Según este análisis se podría sugerir que dentro de este cluster hay 3 genotipos prevalentes, se llama genotipo 1 al conjunto de cepas comprendidas dentro del grupo I, genotipo 2 al conjunto de cepas comprendidas dentro del grupo II y genotipo 3 al conjunto de cepas comprendidas dentro del grupo III, estos perfiles estarían asociados a la resistencia penicilina-ampicilina.

Al realizar el análisis de coordenadas principales, con los tres cebadores se observan asociaciones entre lugar de aislamiento, sitio de infección y resistencia a metilicina (Figura 26).



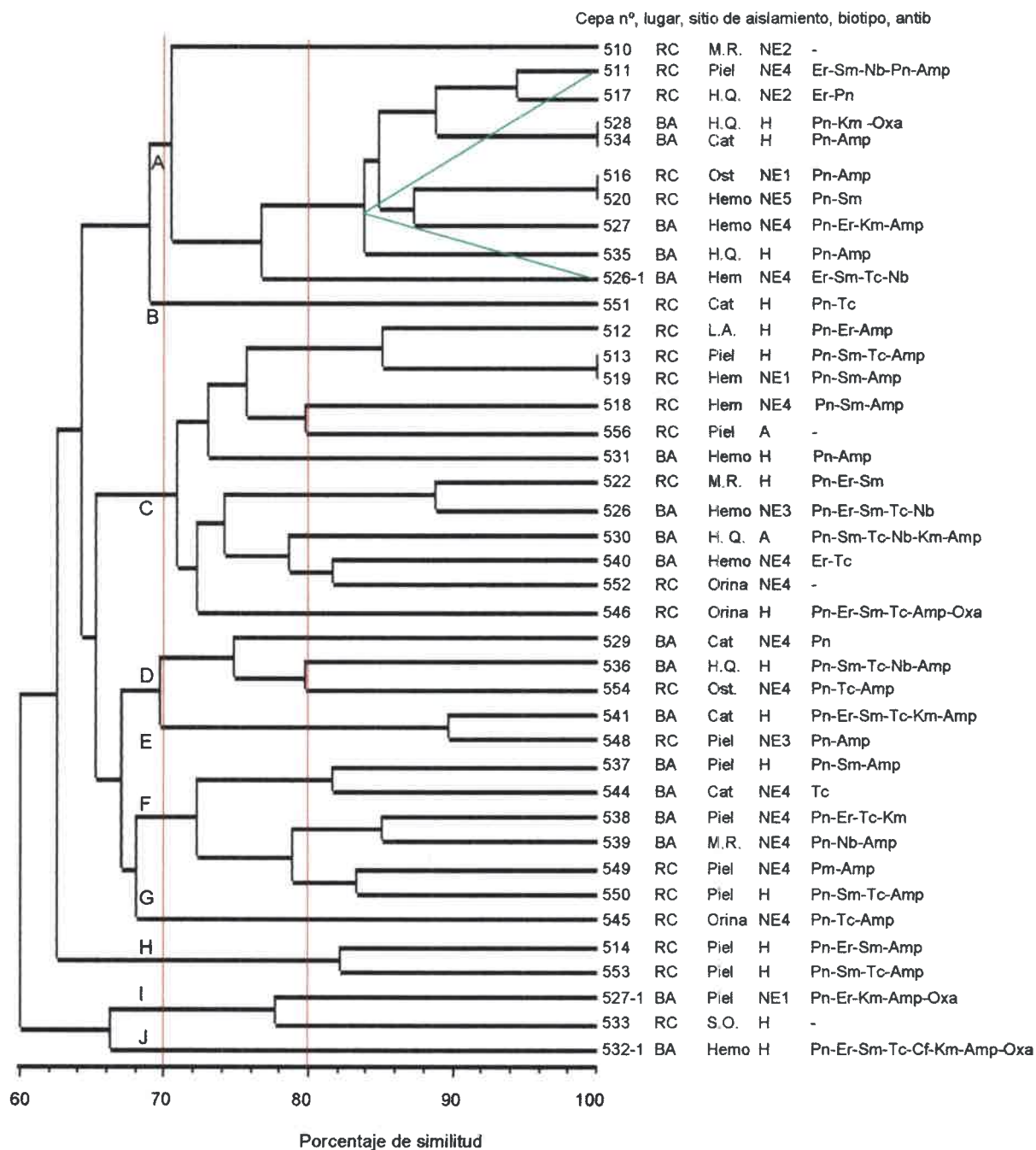
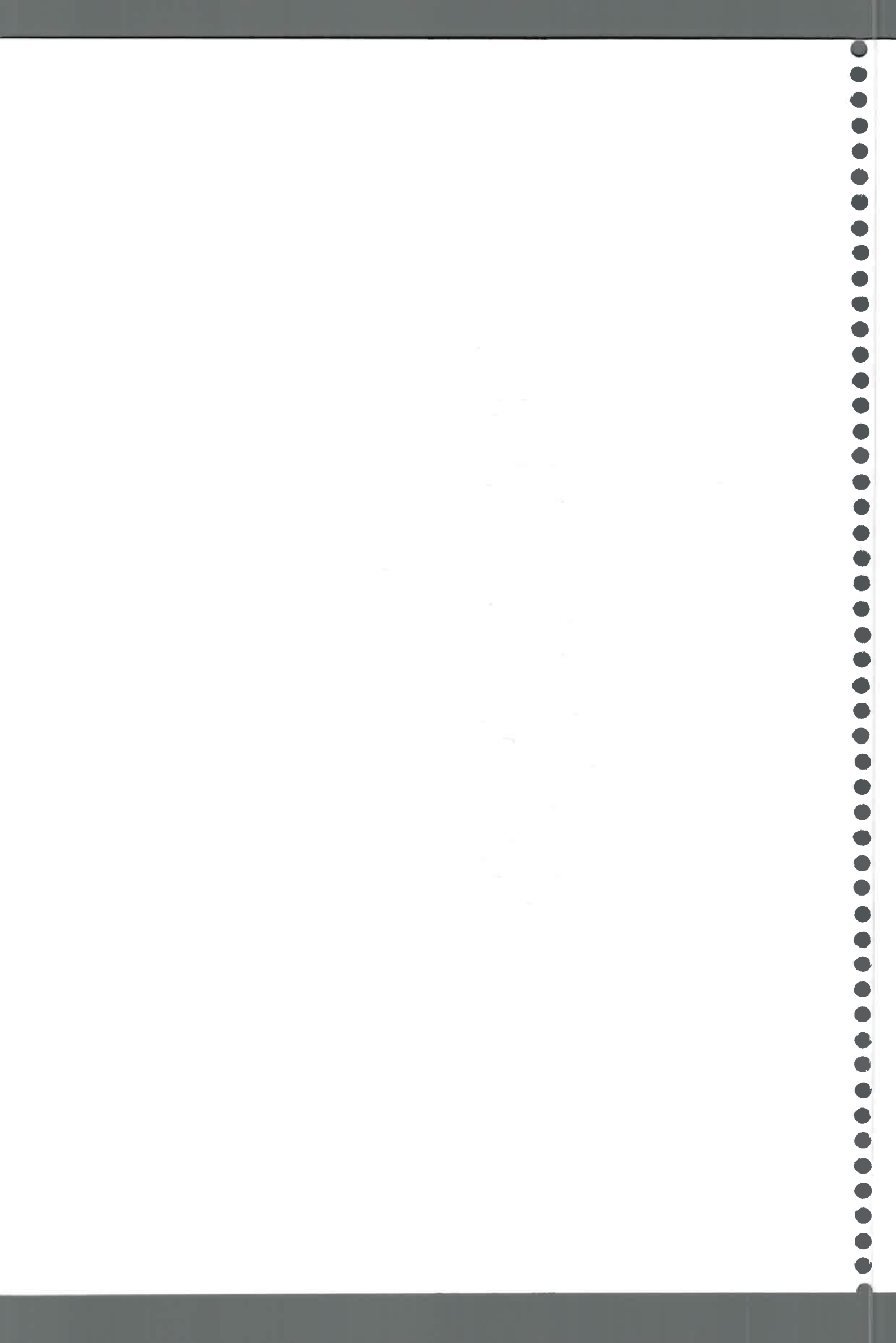


Figura 22: Dendrograma construido mediante el análisis de UPGMA de cepas humanas ensayadas con el *cebador* OLP6.



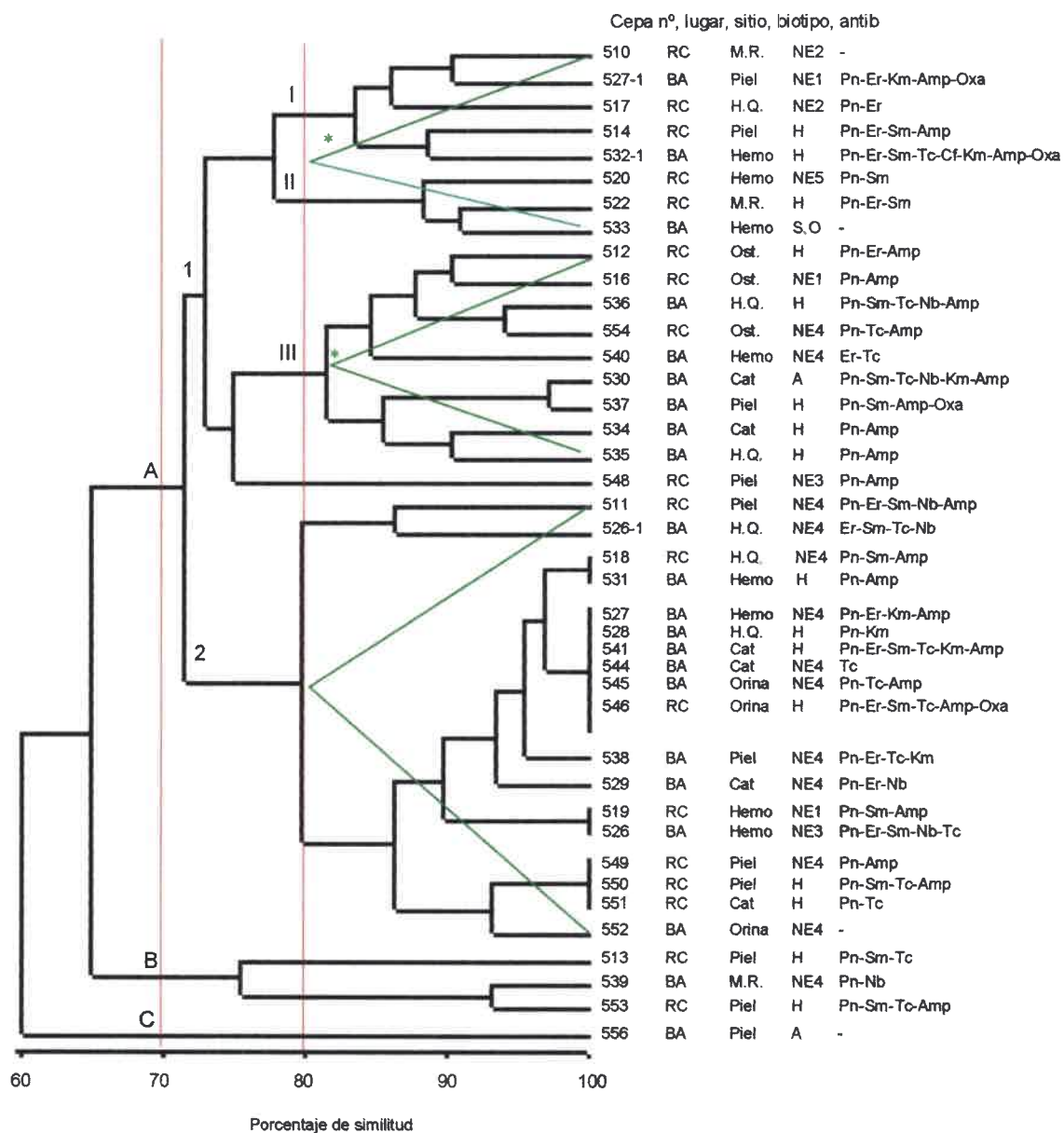
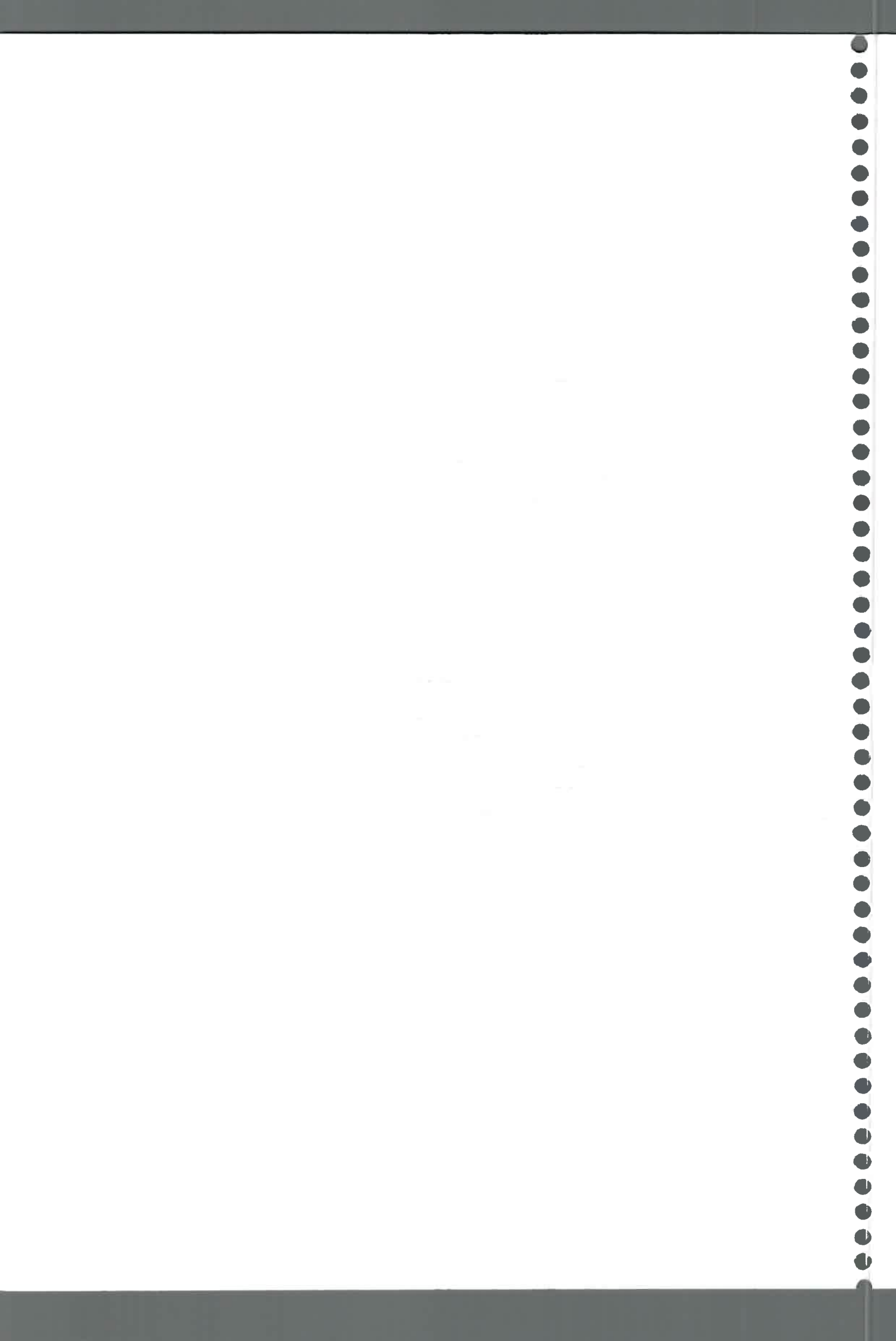


Figura 23: Dendrograma construido mediante el análisis de UPGMA de cepas aisladas de episodios clínicos en humanos ensayadas con el cebador OLP11.
 *= iguales genotipos



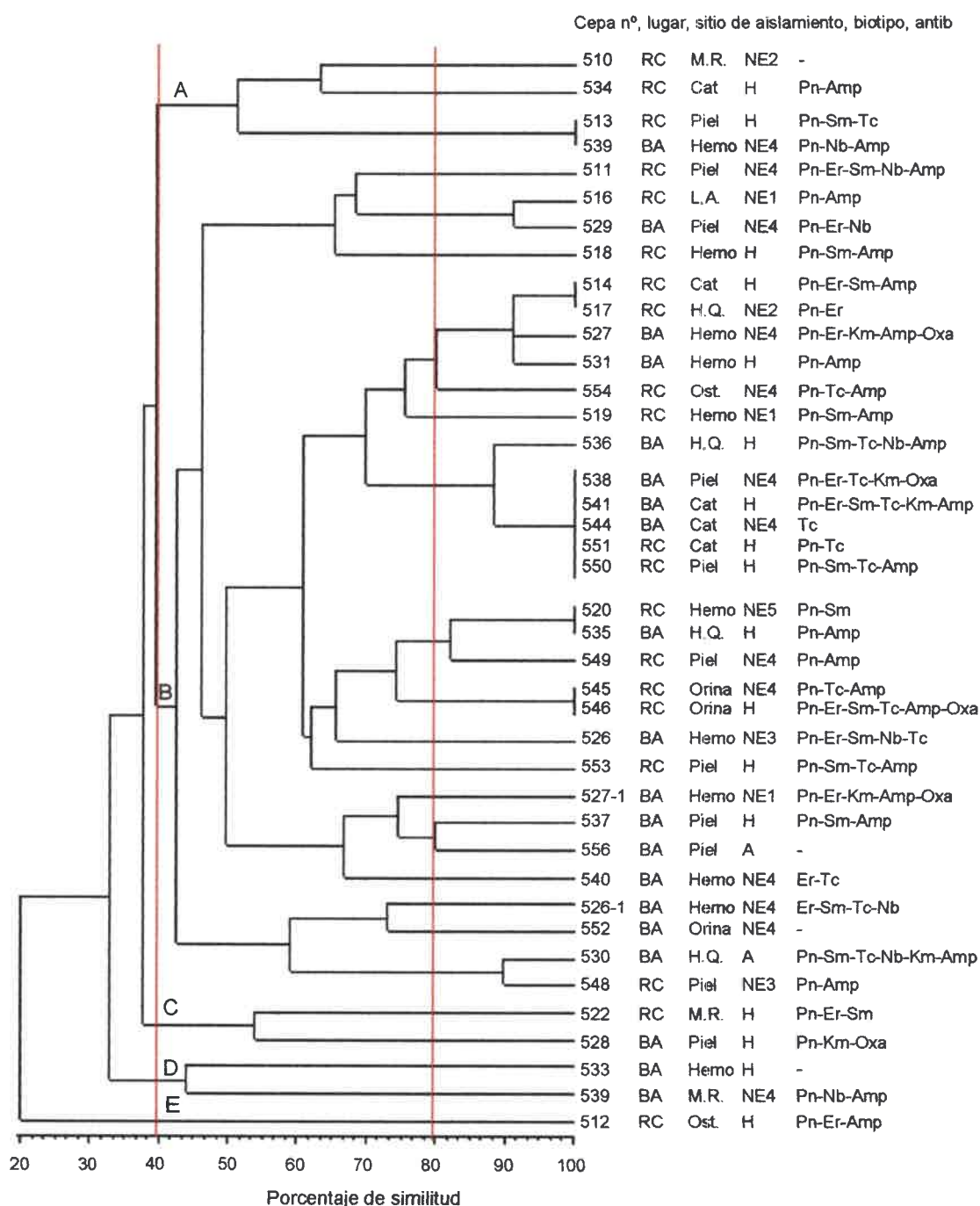
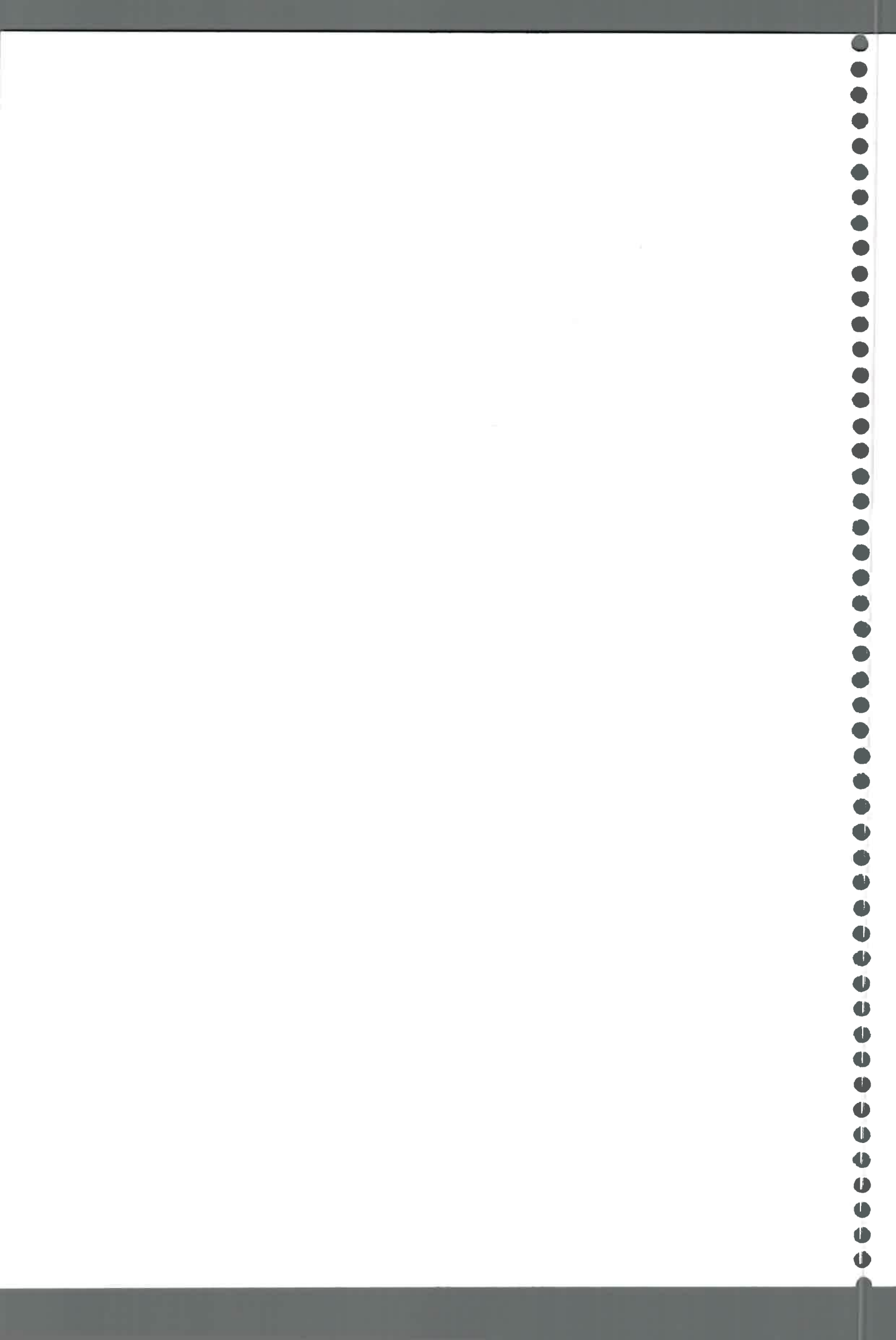


Figura 24: Dendrograma construido mediante el análisis de UPGMA de cepas aisladas de episodios clínicos en humanos ensayadas con el cebador OLP13.



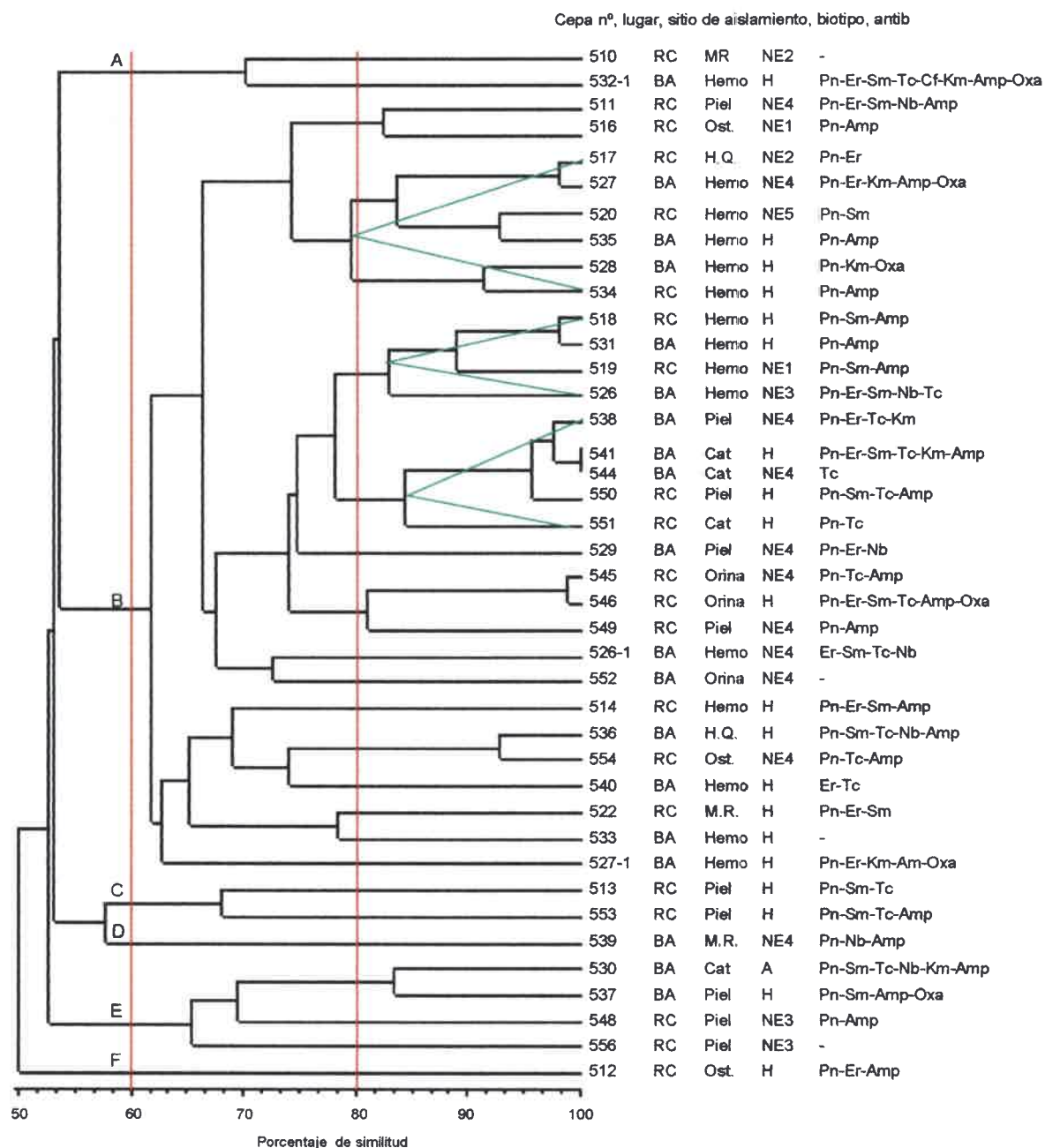
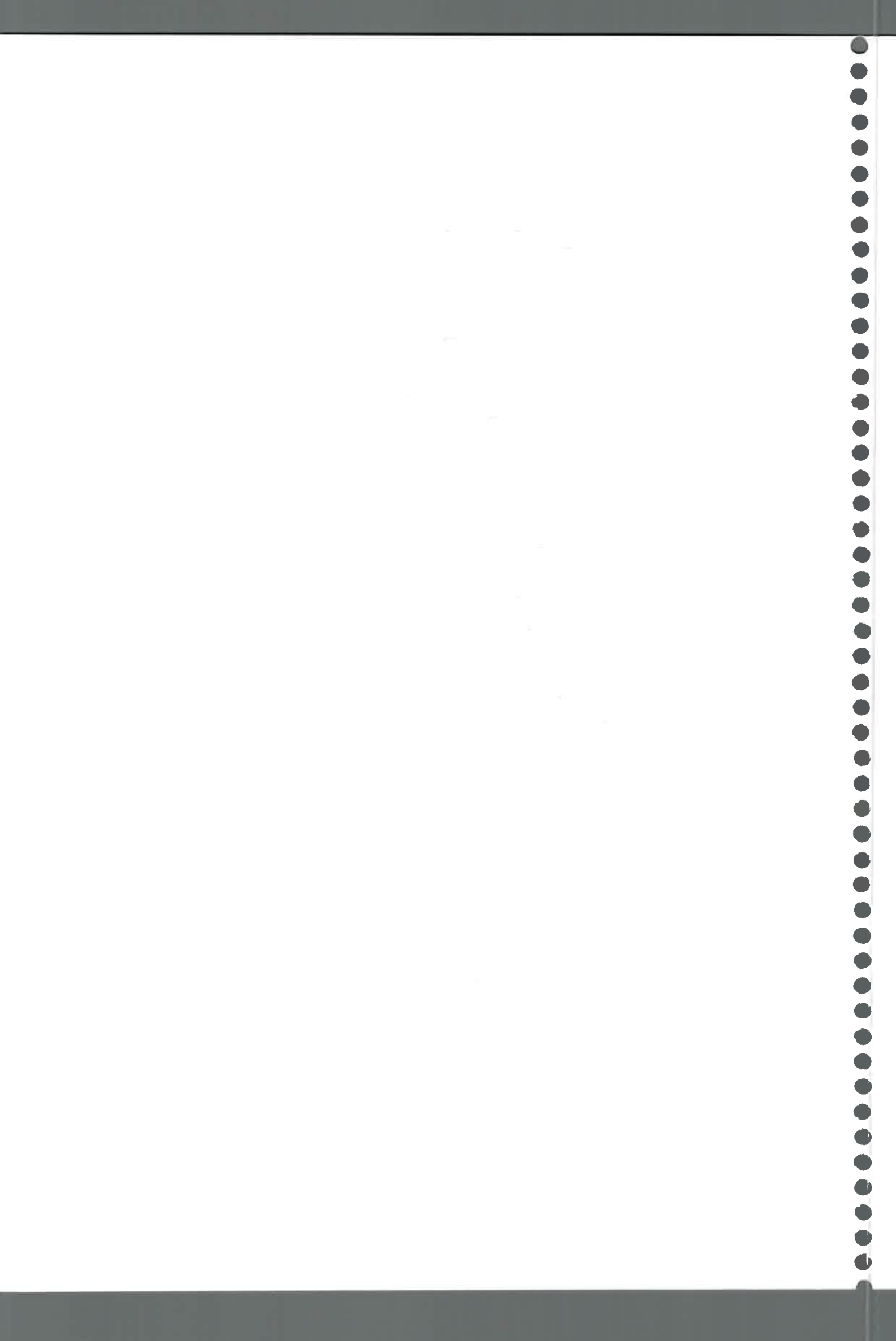


Figura 25: Dendrograma construido mediante el análisis de UPGMA de cepas aisladas de episodios clínicos en humanos ensayadas con los cebadores OLP6, OLP11 y OLP13.



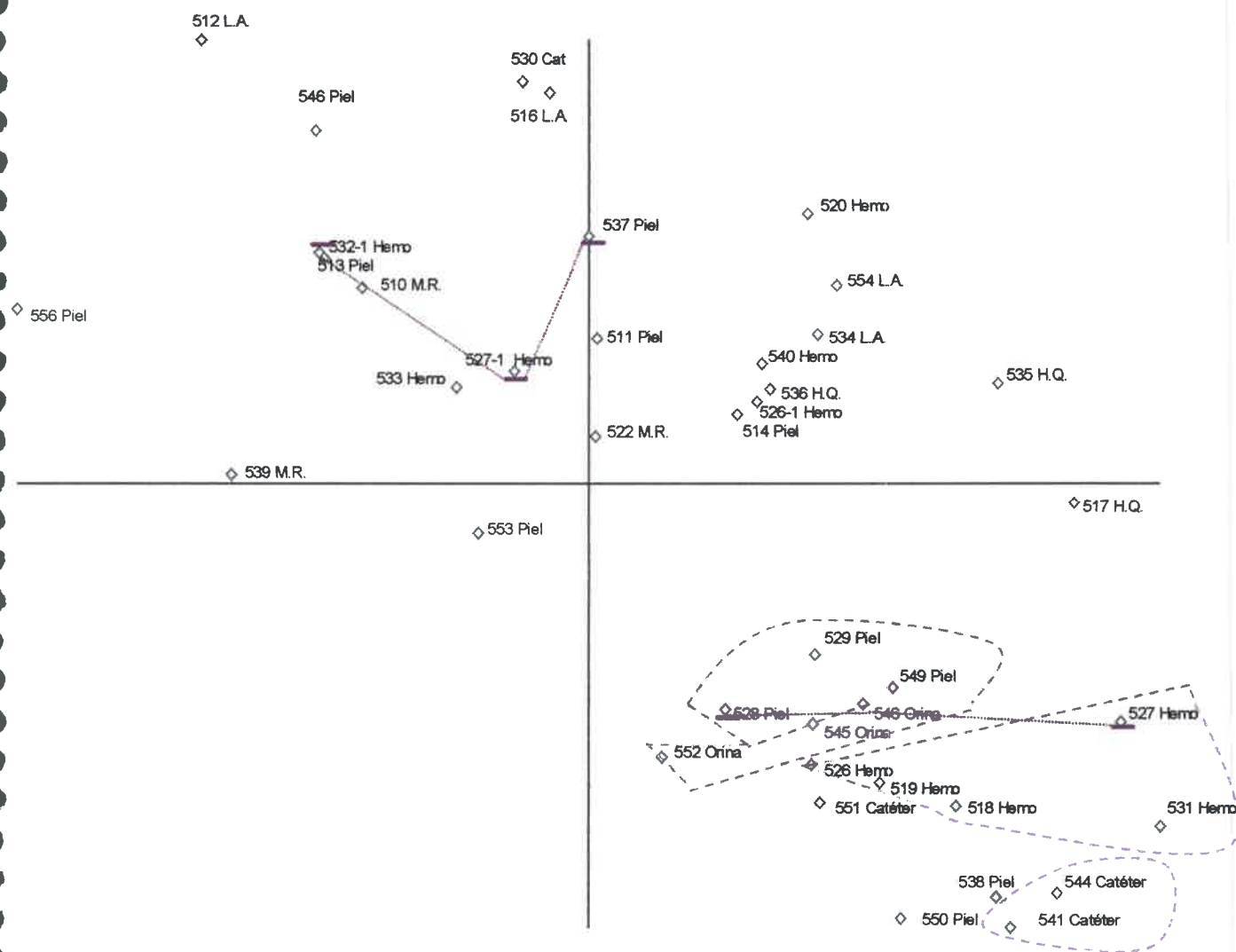
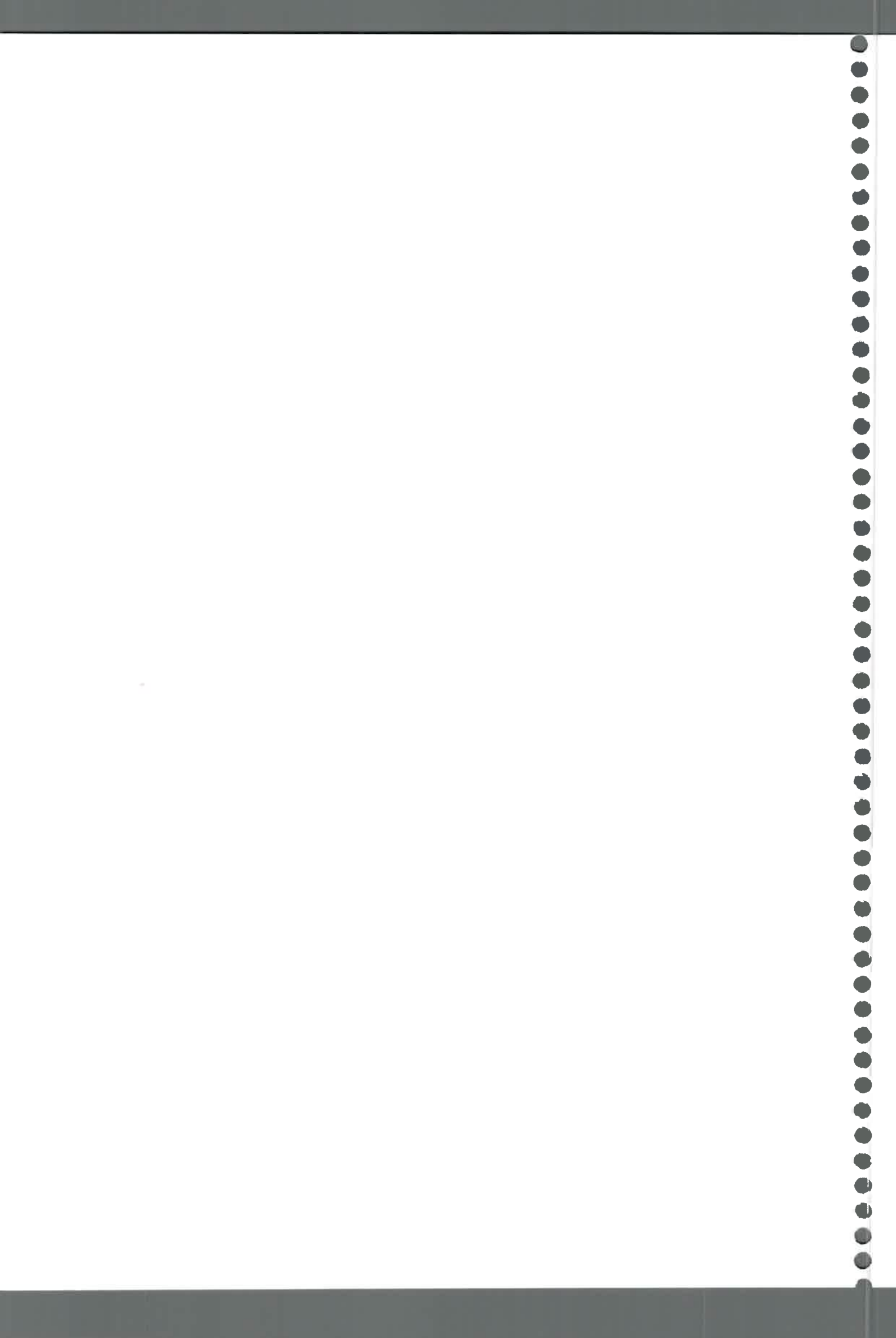


Figura 26: Análisis de coordenadas principales realizado por RAPD-PCR con los cebadores OLP6, OLP11 y OLP13 a partir del análisis de cepas humanas.



b) Cepas de *S. aureus* aisladas de bovinos

Se realizó el análisis de las cepas bovinas con cada uno de los cebadores y con la combinación de ellos.

- Cebador OLP6

El análisis de las cepas bovinas aisladas de la región de Córdoba, a una similitud genética relativa del 80% muestra 20 clusters los cuales comprenden varios grupos con pocas cepas, cada grupo corresponde a un genotipo (Figura 27). Este cebador, como también fue observado en el análisis de cepas aisladas de huéspedes humanos, tiene un alto poder de discriminación. Se observa que las cepas 663 y 664 son similares genotípicamente, tienen el mismo biotipo y pertenecen al mismo tambo, por lo tanto podrían estar relacionadas epidemiológicamente. Lo mismo podría estar ocurriendo con las cepas 606 y 612, aunque no comparten el mismo biotipo. El grupo de cepas formado por 660, 603, 618 y 619 tienen un mismo genotipo, diferentes biotipos y corresponden a tres tambos distintos.

- Cebador OLP11

Este cebador es el que agrupa la mayor cantidad de cepas (aisladas de la región de Córdoba), en la Figura 28 se puede observar que muchas cepas se agrupan al 100%. En un primer nivel de agrupamiento al 20%, las cepas se dividen en 6 grupos. Los grupos A y B comprenden 19 cepas aisladas del tambo A (77%). En un segundo nivel de agrupamiento al 80% se observan 16 genotipos. Las vacas del tambo A están infectadas con cepas de *S. aureus* correspondientes a 9 genotipos diferentes. Las cepas del tambo B se mezclan con las cepas del tambo A. Las cepas del tambo C pertenecen a 5 genotipos diferentes. De acuerdo a estos resultados existirían ciertos genotipos asociados a un tambo determinado. No se encontró asociación entre genotipos, ecotipos y resistencia a antibióticos.



-Cebador OLP13

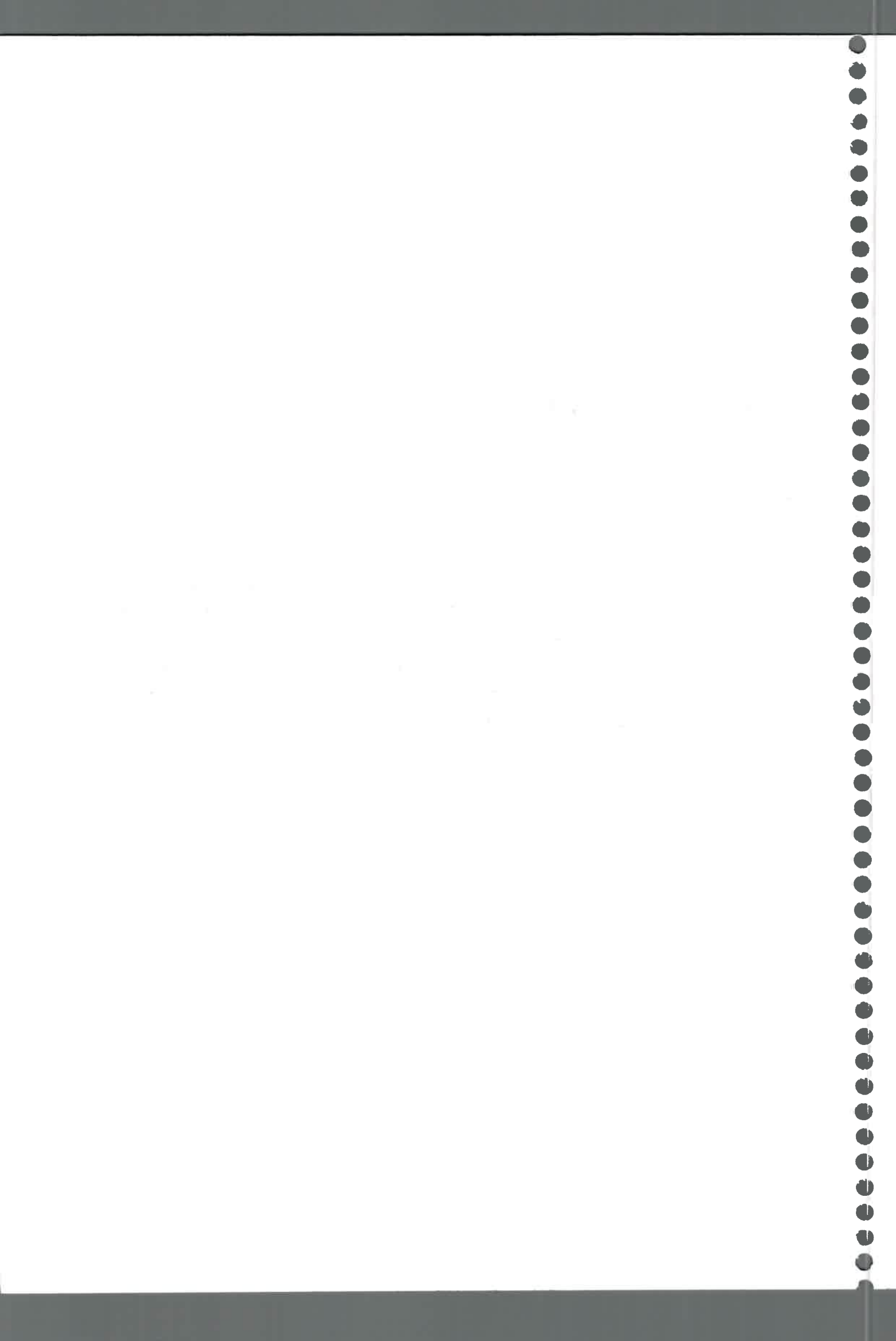
En la Figura 29 se muestran los perfiles de las cepas ensayadas (aisladas de la región de Córdoba), en un primer nivel de agrupamiento se encuentran 8 grupos (A-H) y al 80% al igual que con el cebador OLP6 las cepas se agrupan en varios clusters cada uno con pocas cepas.

-Cebadores OLP6, OLP11 y OLP13

En la Figura 30 se observa que las cepas pudieron agruparse en 10 clusters (A-J), y al 80% de similitud en 30 genotipos diferentes.

En todos los dendrogramas las cepas del tambo D se mezclan con las del tambo B y A. Algunas de las cepas del tambo C se agrupan en el mismo cluster, pero un bajo porcentaje se agrupa en otro cluster con cepas pertenecientes al tambo A. Por otro lado, las cepas del tambo A se asocian principalmente con el ecotipo bovino.

El dendrograma de las cepas aisladas de la región de Buenos Aires (Figura 31) muestra que todas las cepas tienen un perfil común ya que al 20% de similitud genética se encuentra un grupo grande que asocia a todas las cepas.



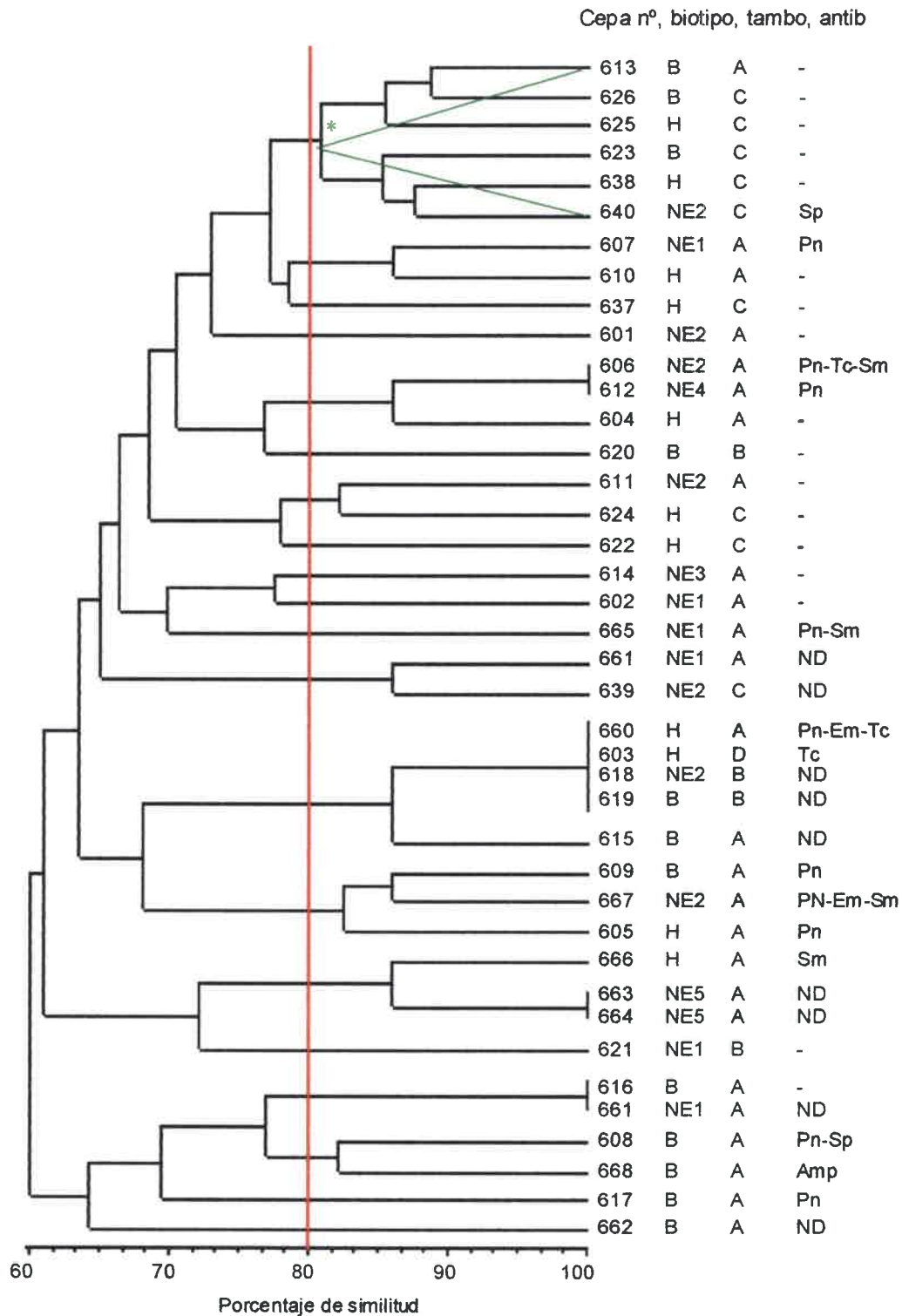
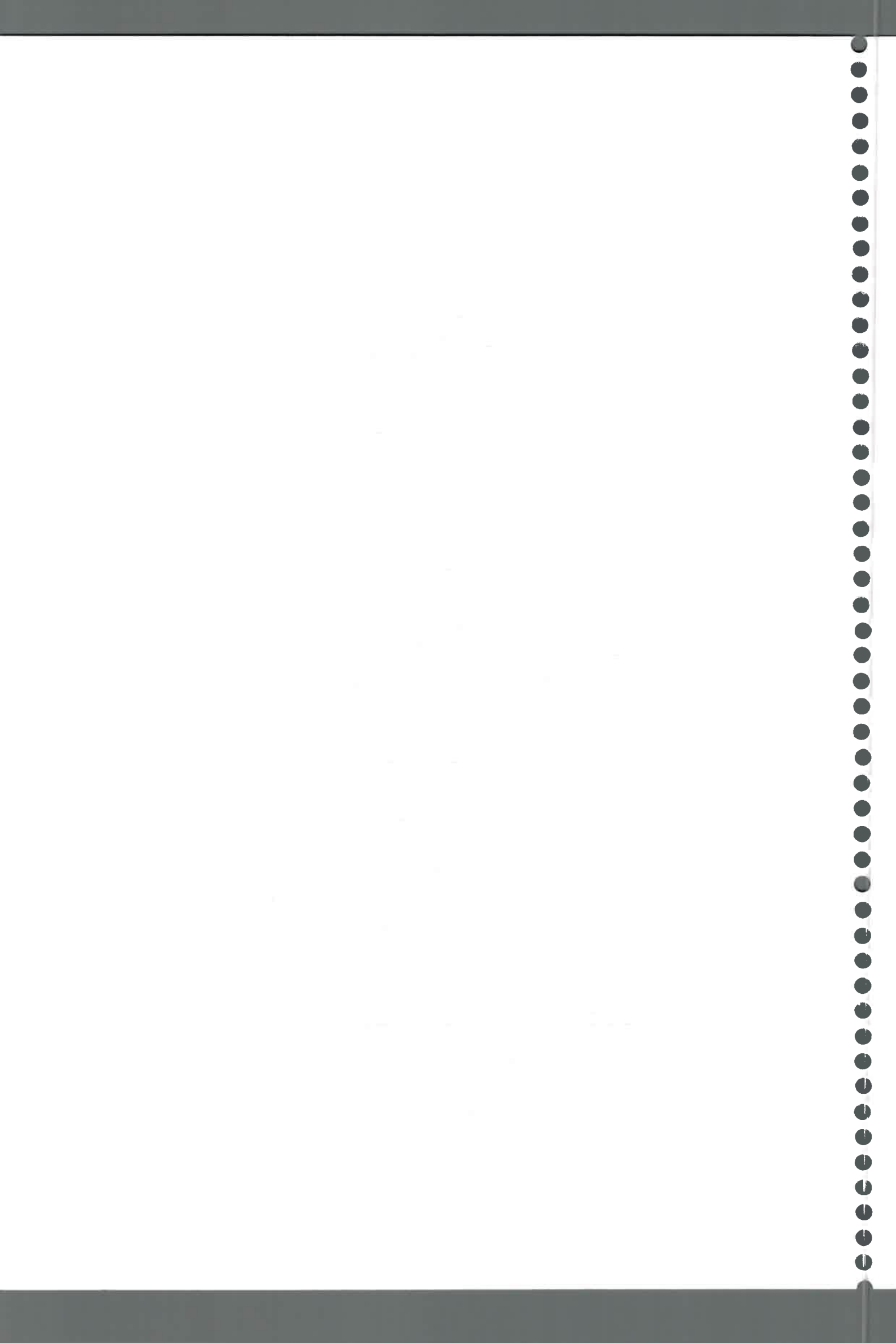


Figura 27: Dendrograma construido mediante el análisis de UPGMA de cepas aisladas de mastitis bovina de la región de Córdoba ensayadas con el cebador OLP6.



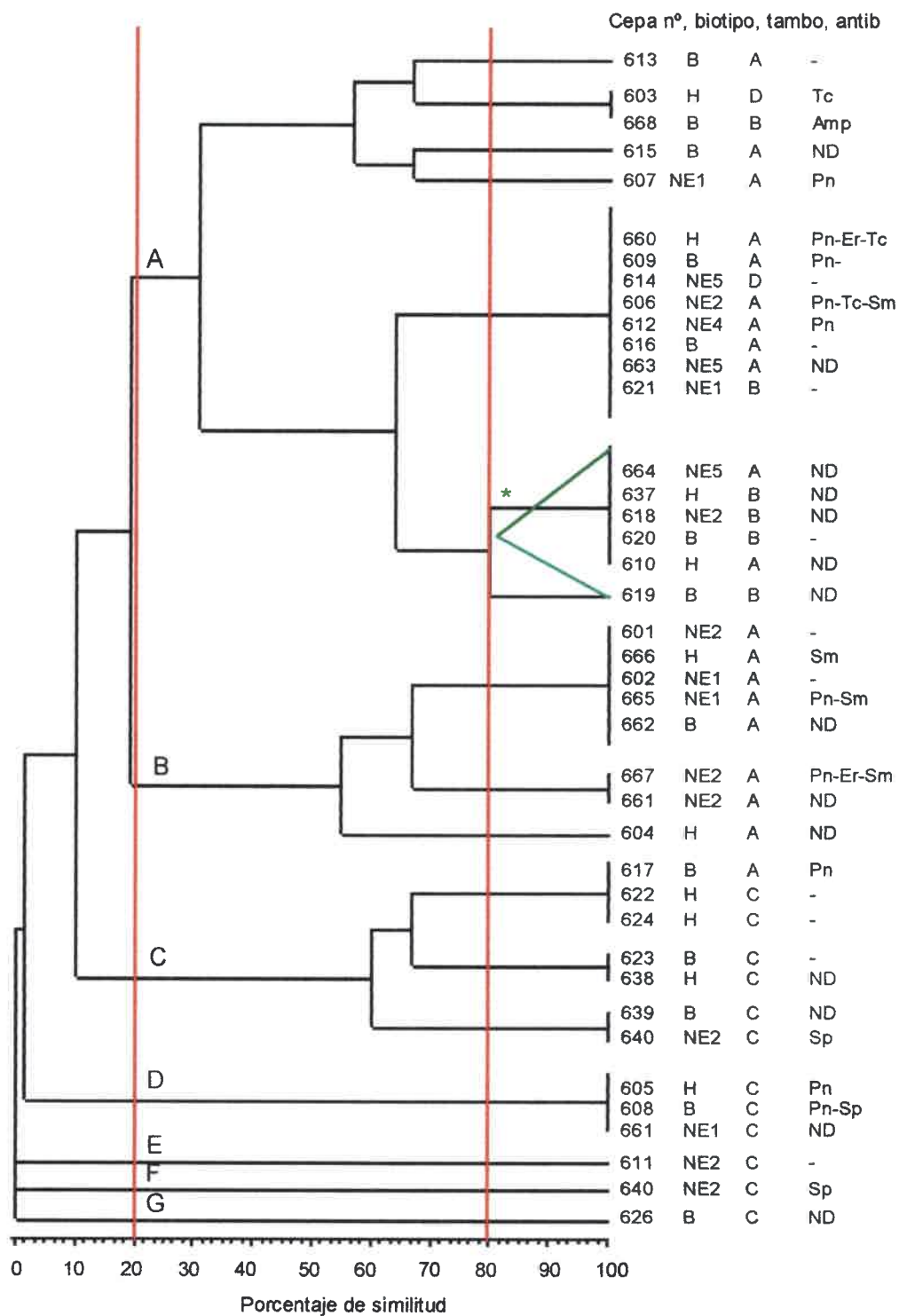
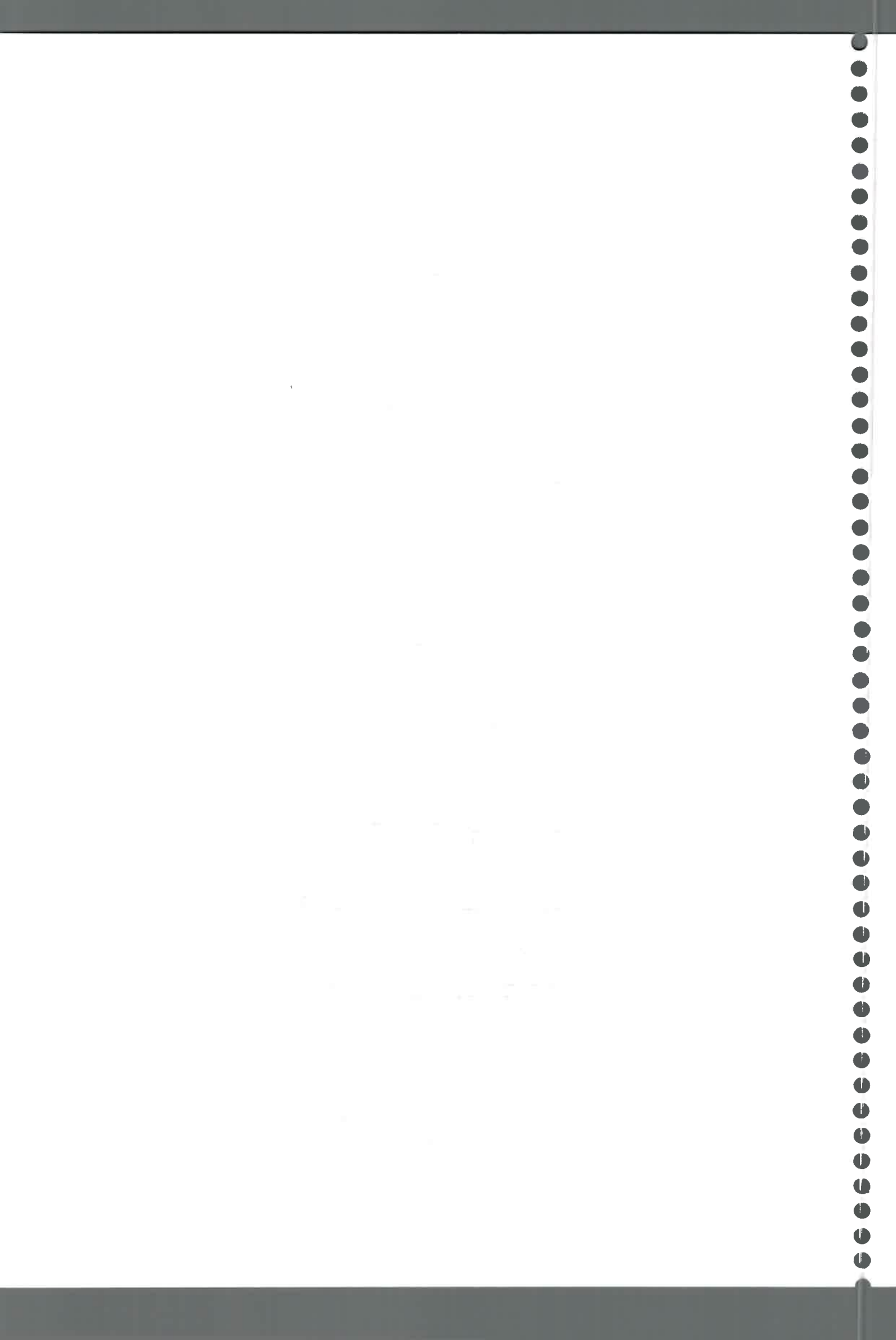


Figura 28: Dendrograma construido mediante el análisis de UPGMA de cepas aisladas de mastitis bovina de la región de Córdoba ensayadas con el cebador OLP11.



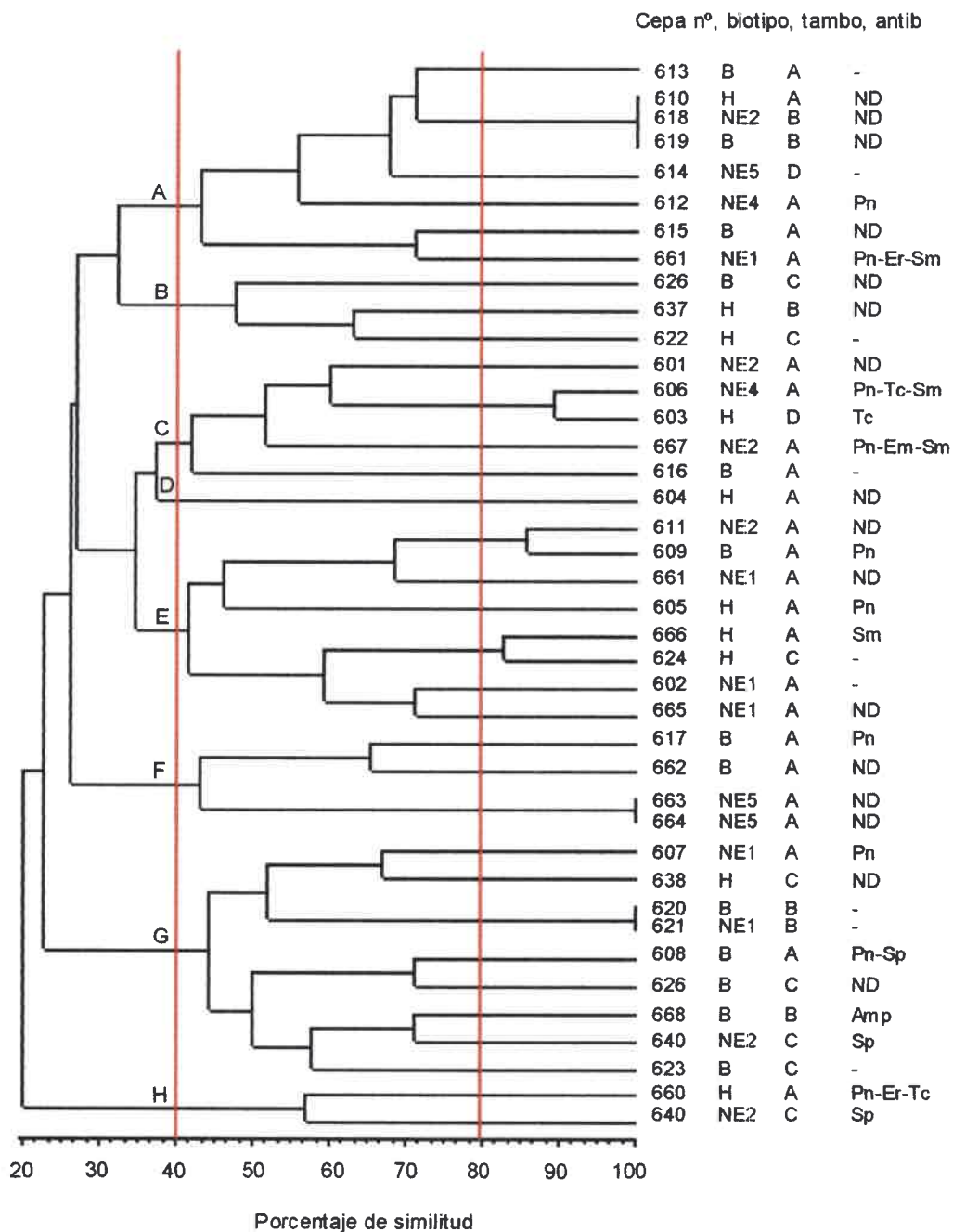
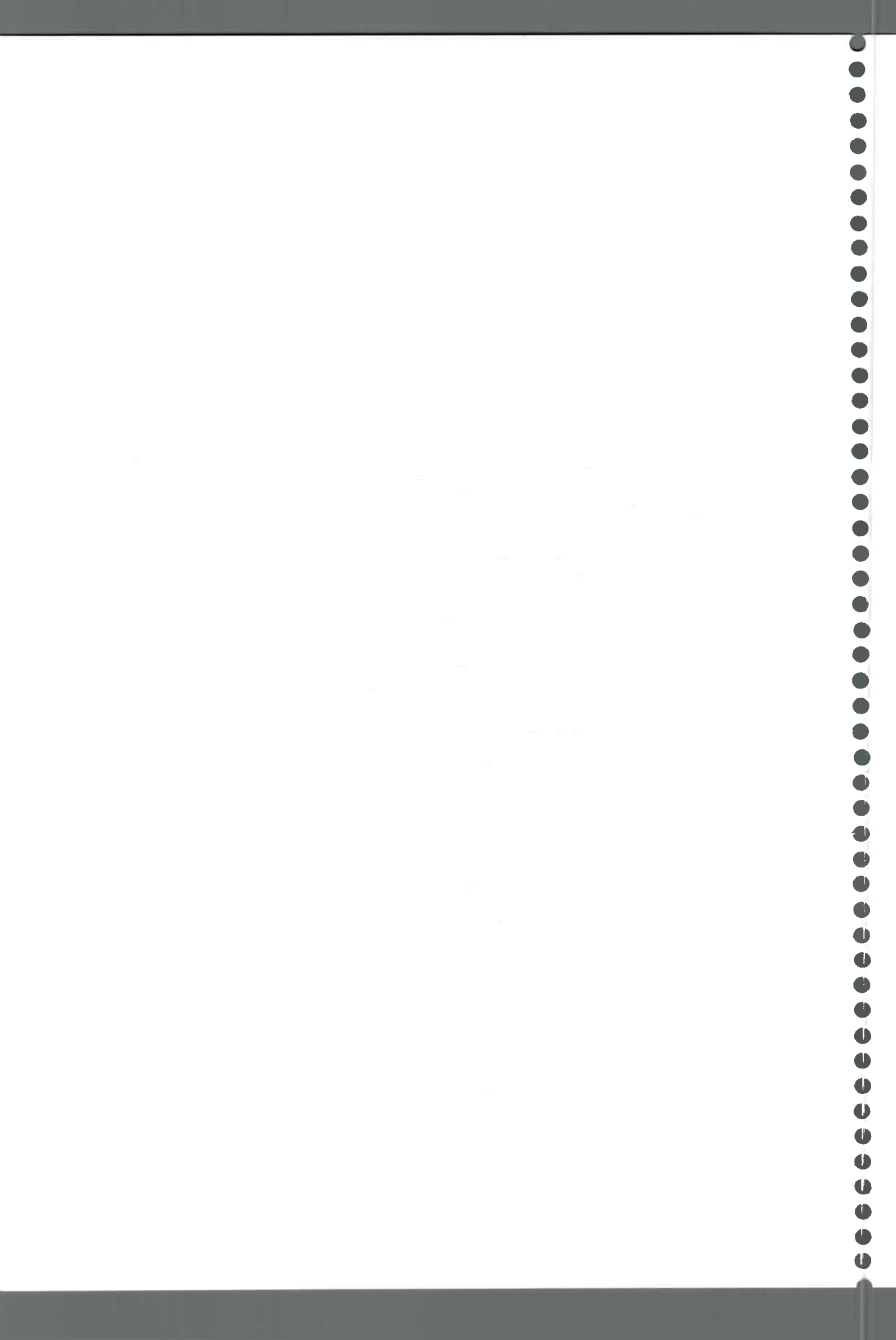


Figura 29: Dendrograma construido mediante el análisis de UPGMA de cepas aisladas de mastitis bovina de la región de Córdoba ensayadas con el cebador OLP13.



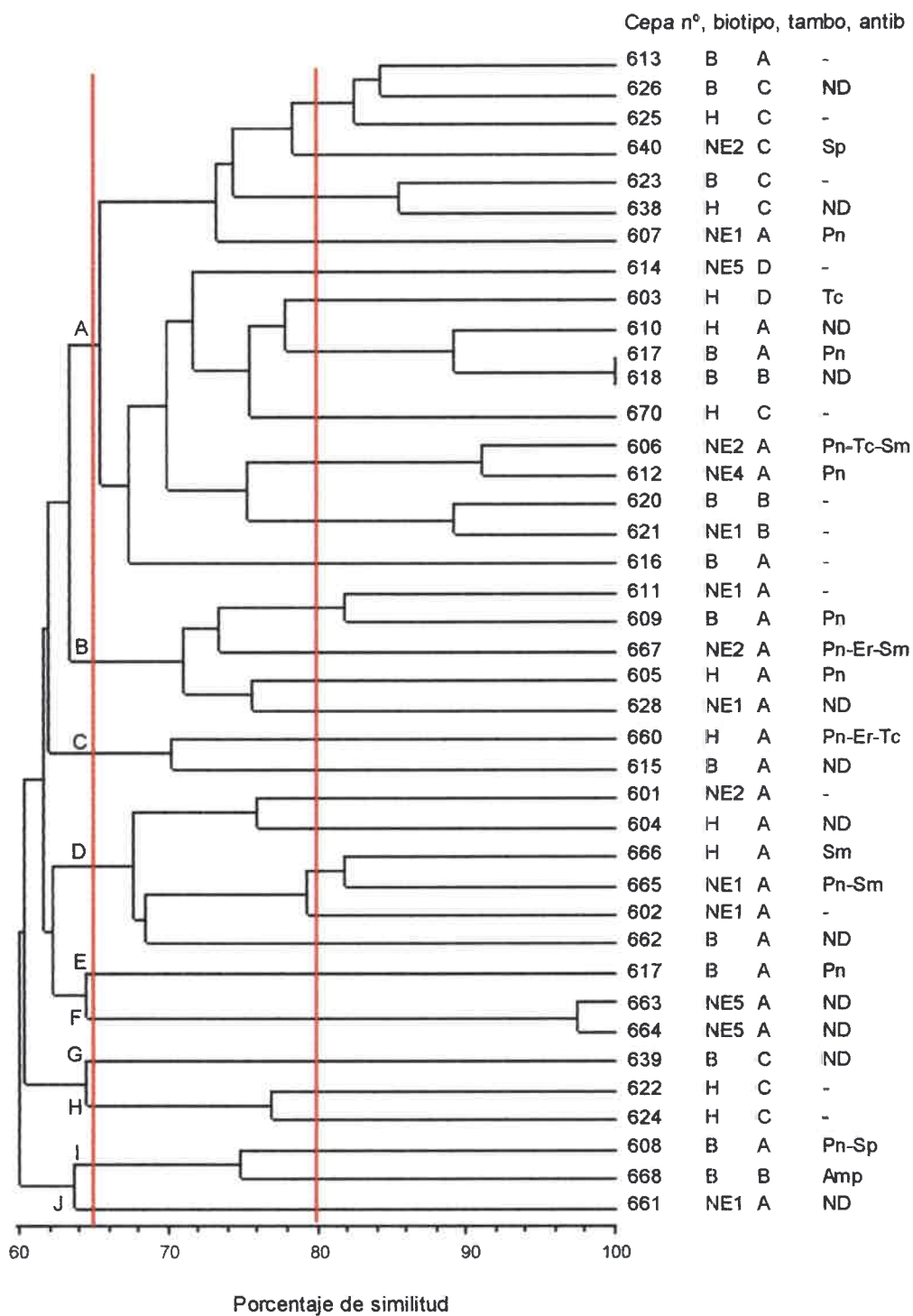
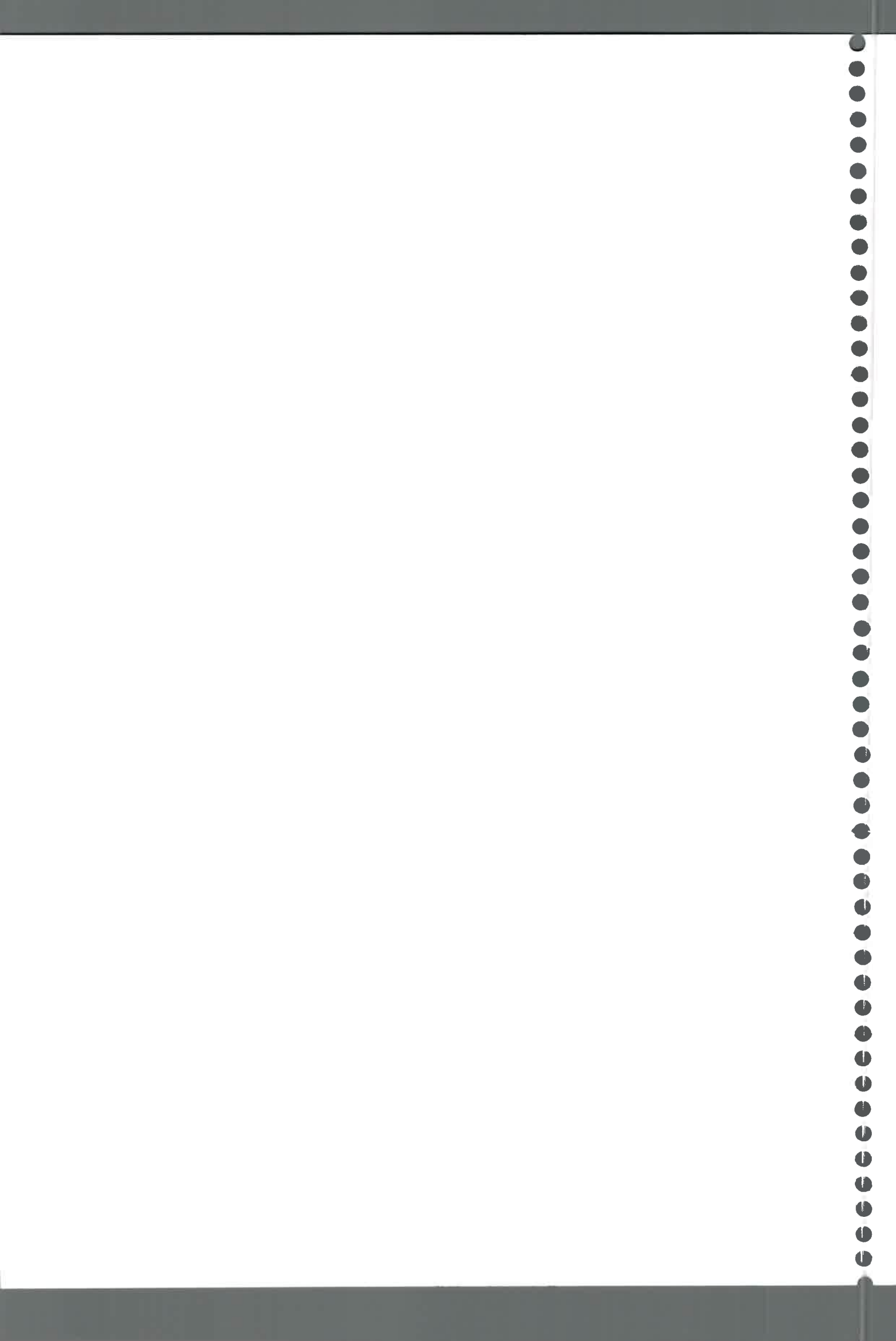


Figura 30: Dendrograma construido mediante el análisis de UPGMA de cepas aisladas de mastitis bovina de la región de Córdoba ensayadas con el cebador OLP6, OLP11 y OLP13.



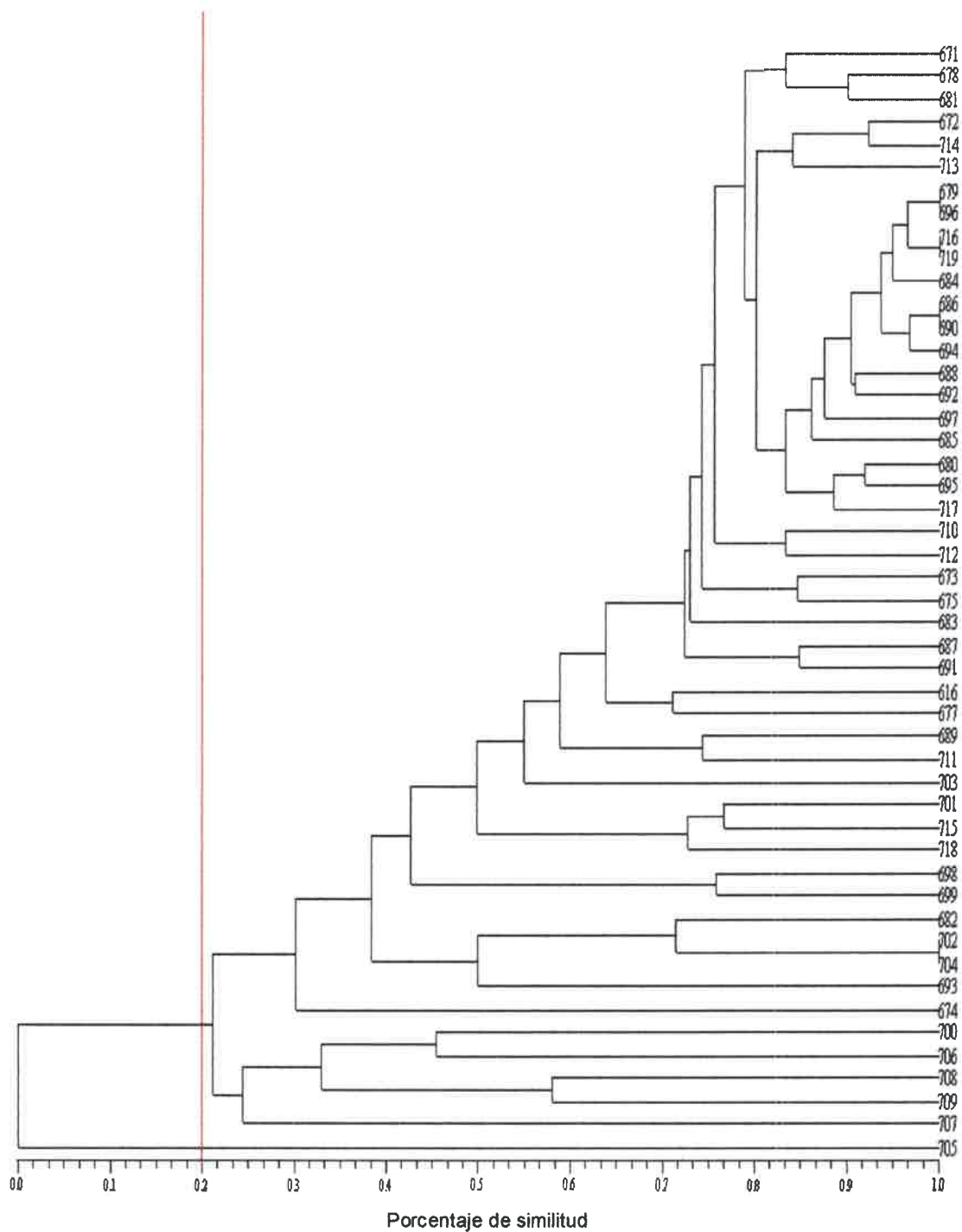
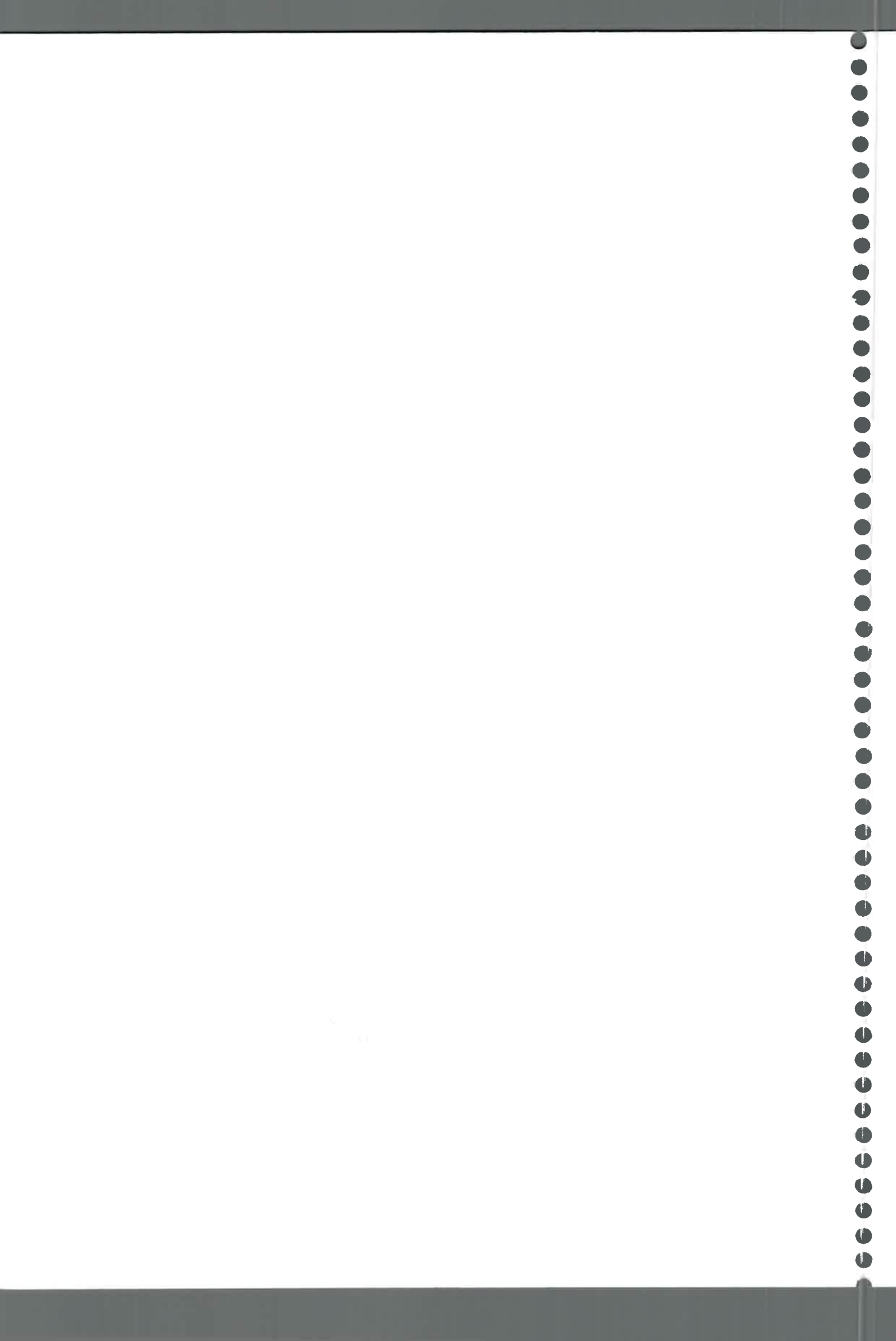


Figura 31: Dendrograma construido mediante el análisis de UPGMA de cepas aisladas de mastitis bovina de la región de Buenos Aires ensayadas con el cebador OLP13.

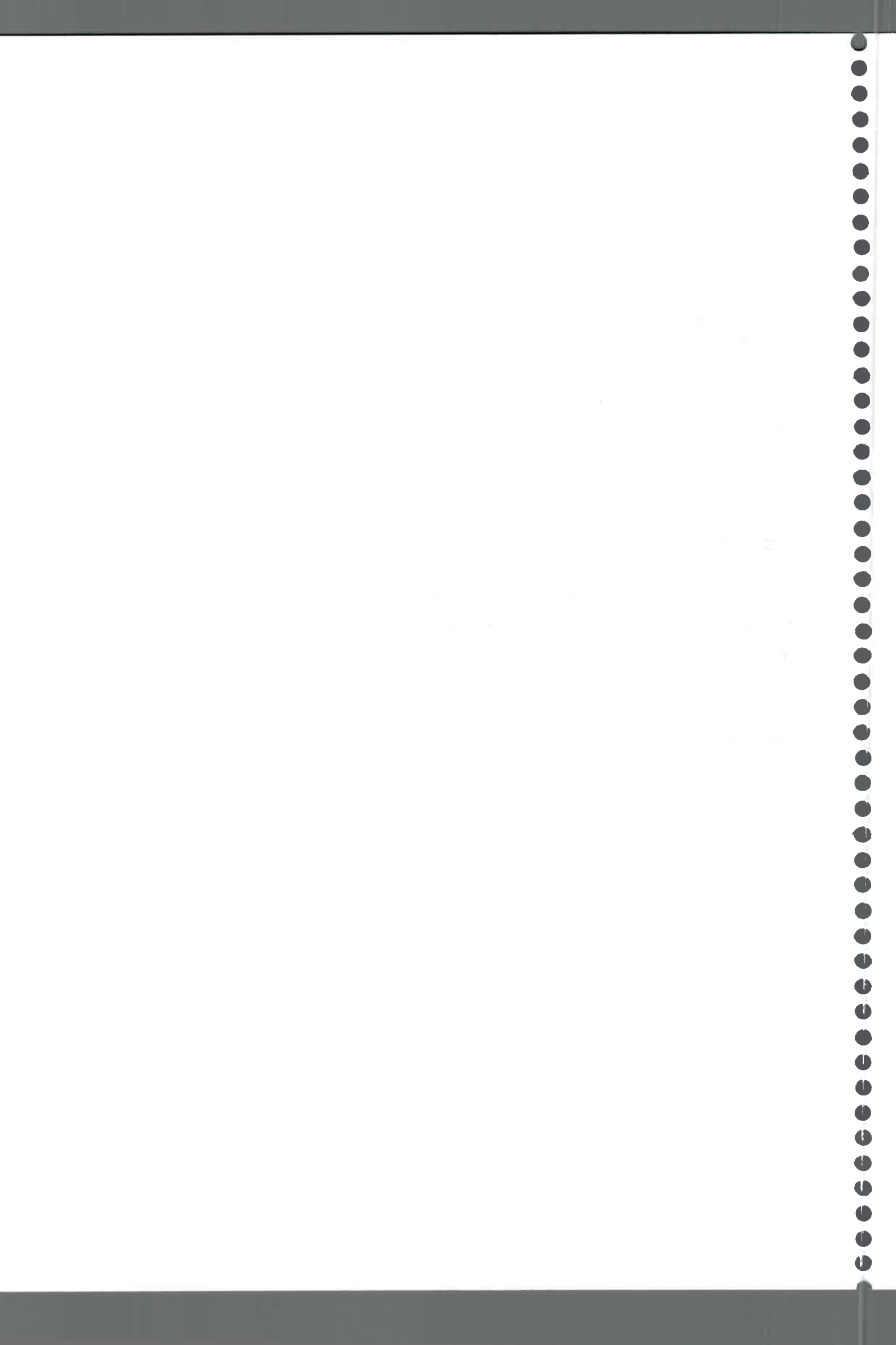


c) Cepas de *S. aureus* aisladas de humanos y de bovinos

Los perfiles de RAPD-PCR de cepas de *S. aureus* aisladas de humanos y bovinos obtenidos con los cebadores OLP6, OLP11 y OLP13 fueron 47, 67 y 68 considerando una similitud genética relativa del 50% (Figuras 32, 33 y 34). Los dendrogramas construidos con cada cebador mostraron que varios aislados no pudieron diferenciarse uno de otro. Además, las cepas que se agrupaban juntas, a veces diferían, dependiendo del cebador usado. Al realizar el análisis con los 3 cebadores, al 30% de similitud, el número de perfiles aumentó a 79 y las cepas se agruparon en 11 grupos (A-K) al ser analizadas con los tres cebadores. En la Figura 35 se muestra que en el grupo A se agrupa el 95% de los aislados humanos, en los restantes grupos se encuentran las cepas bovinas. Los datos fueron confirmados mediante el análisis de coordenadas principales, donde los aislados fueron divididos en dos grupos por la segunda coordenada. Sólo 9 cepas (11%) no se agruparon en ninguno de los dos grupos (Figura 36).

El índice de diversidad genética calculado entre las cepas aisladas de diferentes orígenes mostró ser relativamente baja en los aislados bovinos (H_o : 0.36 para bovinos y H_o : 0.56 para humanos). No se encontraron diferencias significativas entre los índices de variabilidad genética de las poblaciones analizadas ($P > 0.05$). Por otro lado, no se encontró una asociación evidente entre biotipificación y RAPD-PCR

La asociación huésped específica ha sido descripta para otras cepas, como *E. Coli*, *Bordetella bronchiseptica*, *Streptococcus agalactiae* [Martínez y col. 2000; Selander y col., 1990; Kapur y col. 1995].



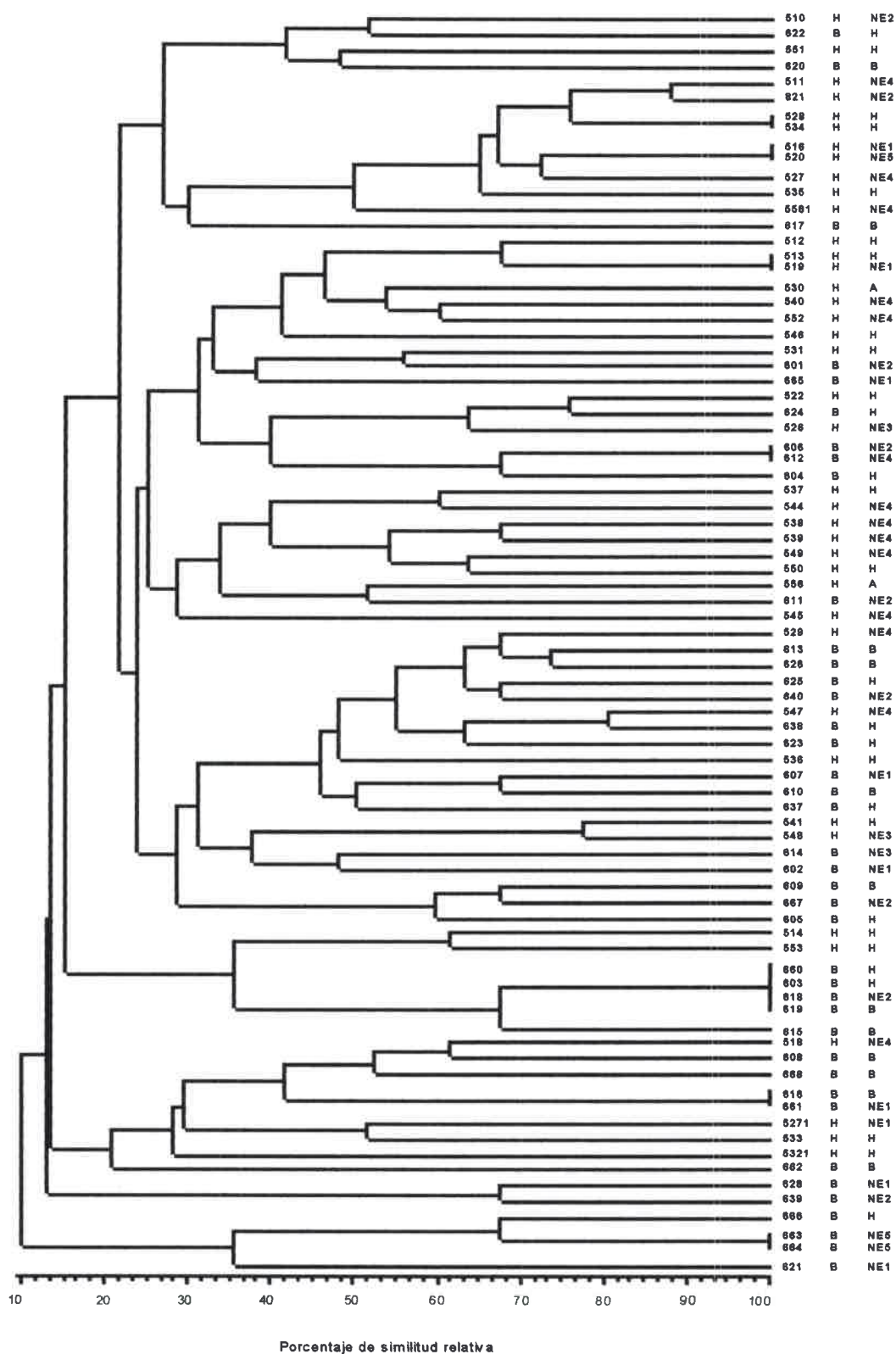


Figura 32: Dendrograma construido mediante el análisis de UPGMA de cepas aisladas de episodios clínicos en humanos y mastitis bovina ensayadas con el cebador OLP6.

[Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page]

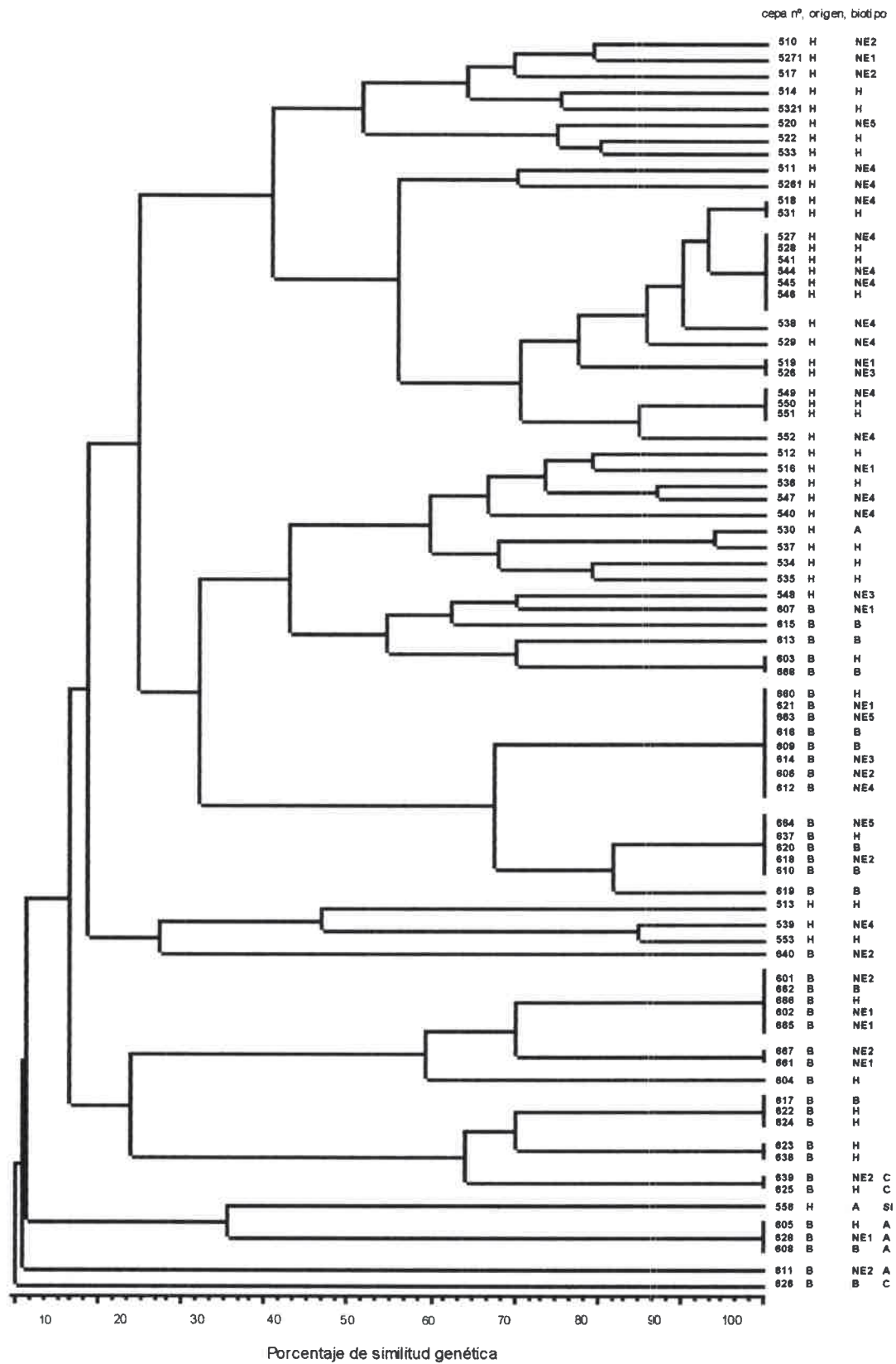
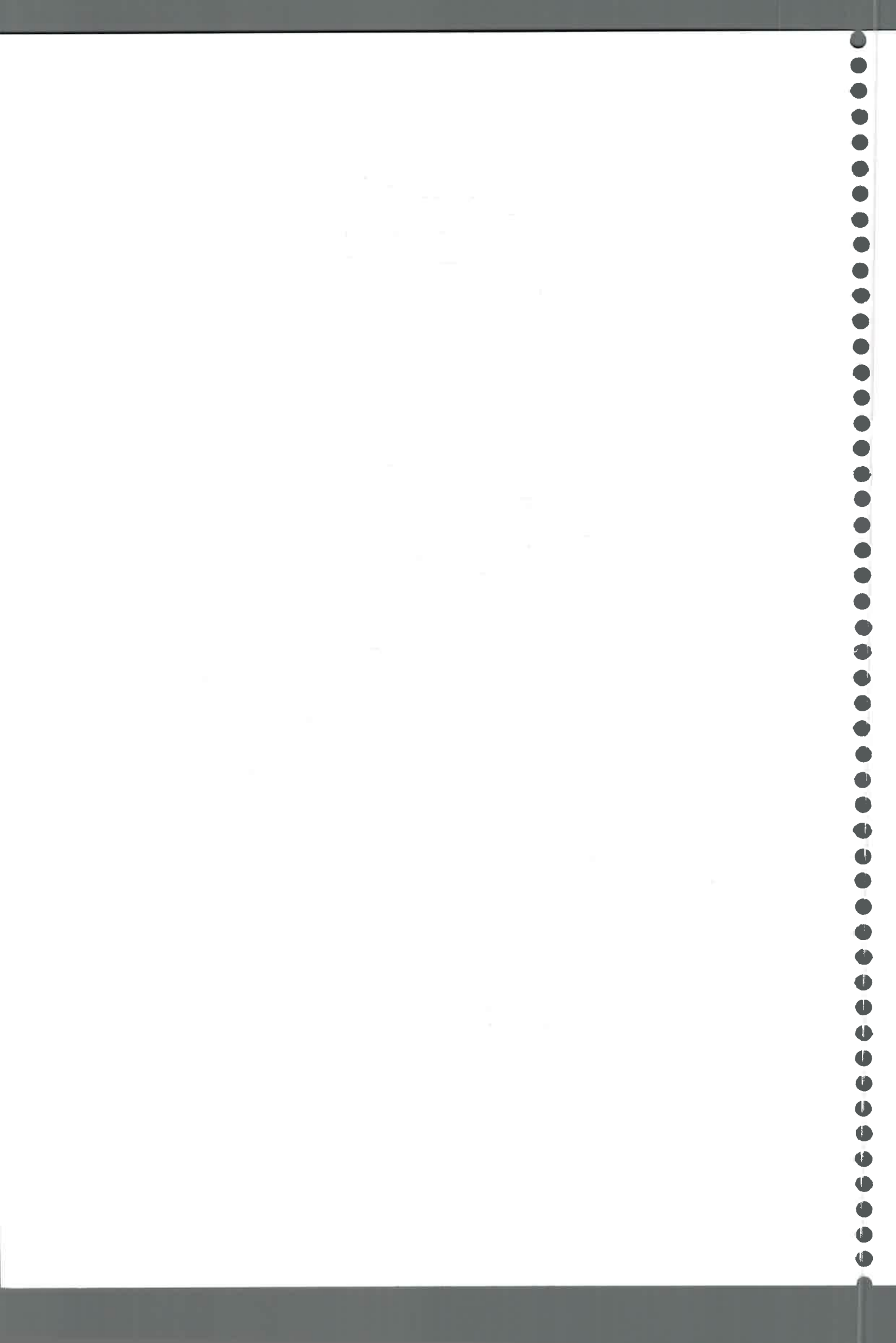


Figura 33: Dendrograma construido mediante el análisis de UPGMA de cepas aisladas de episodios clínicos en humanos y mastitis bovina ensayadas con el cebador OLP11.



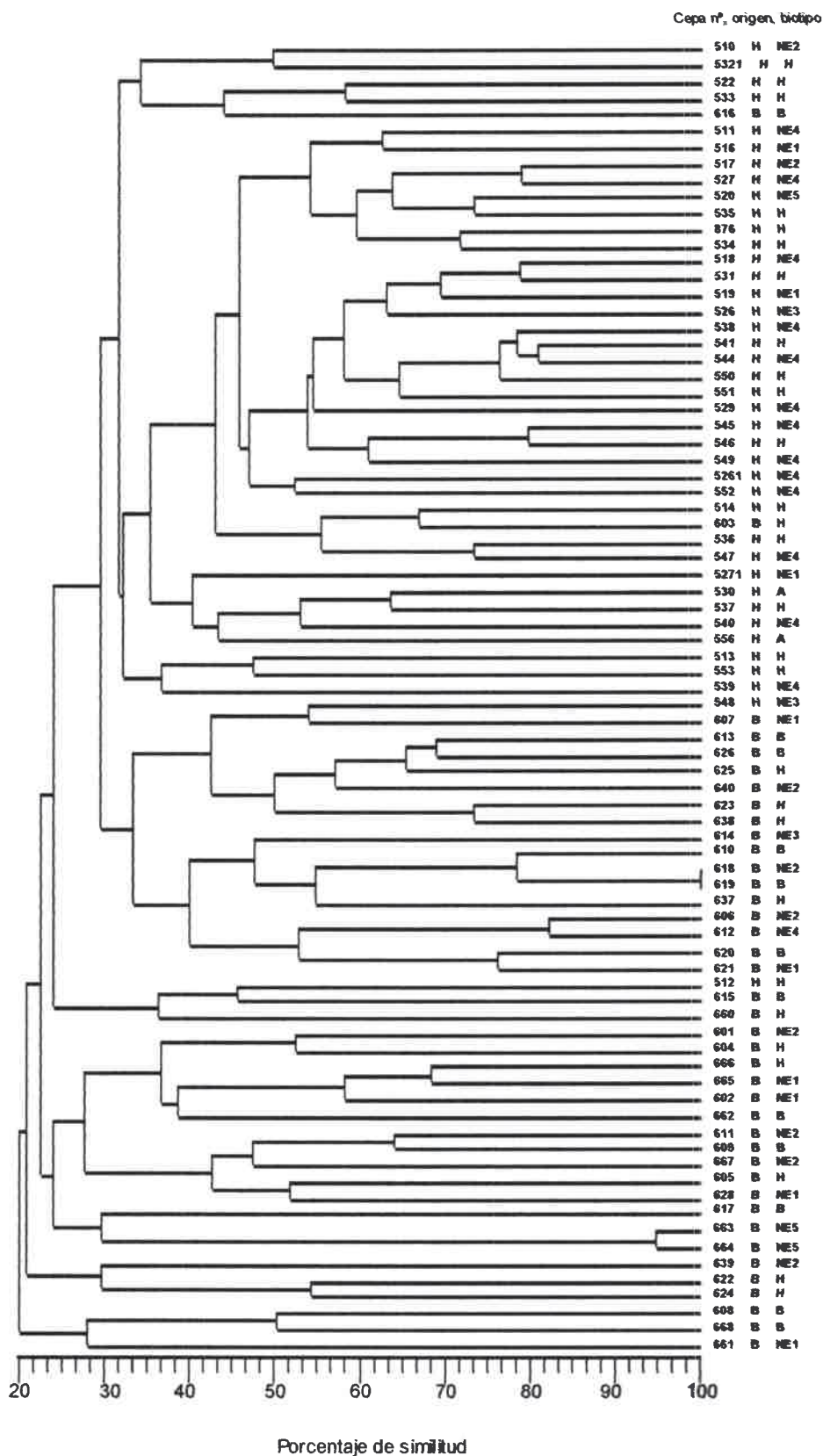
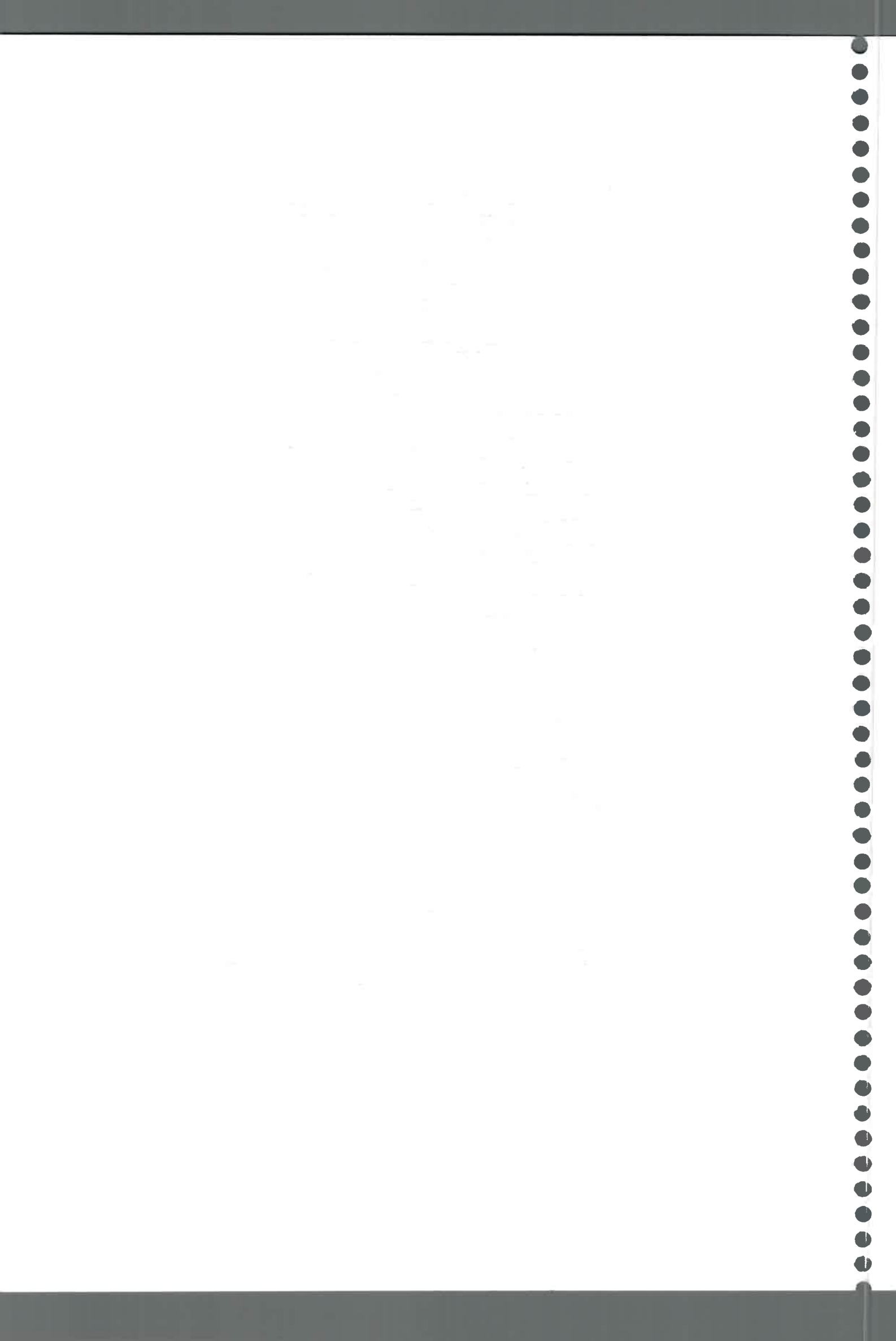


Figura 34: Dendrograma construido mediante el análisis de UPGMA de cepas aisladas de episodios clínicos en humanos y mastitis bovina ensayadas con el cebador OLP13.



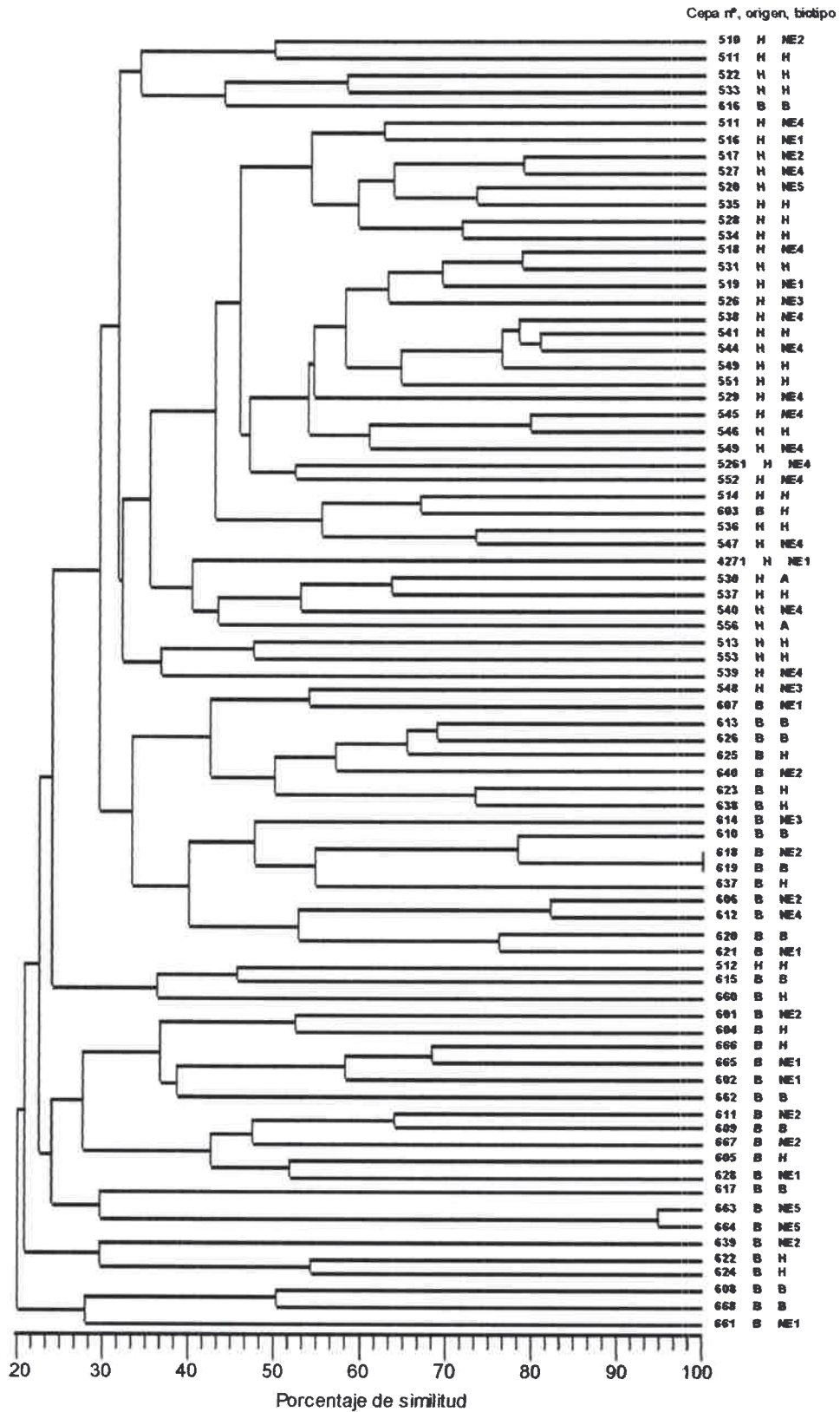
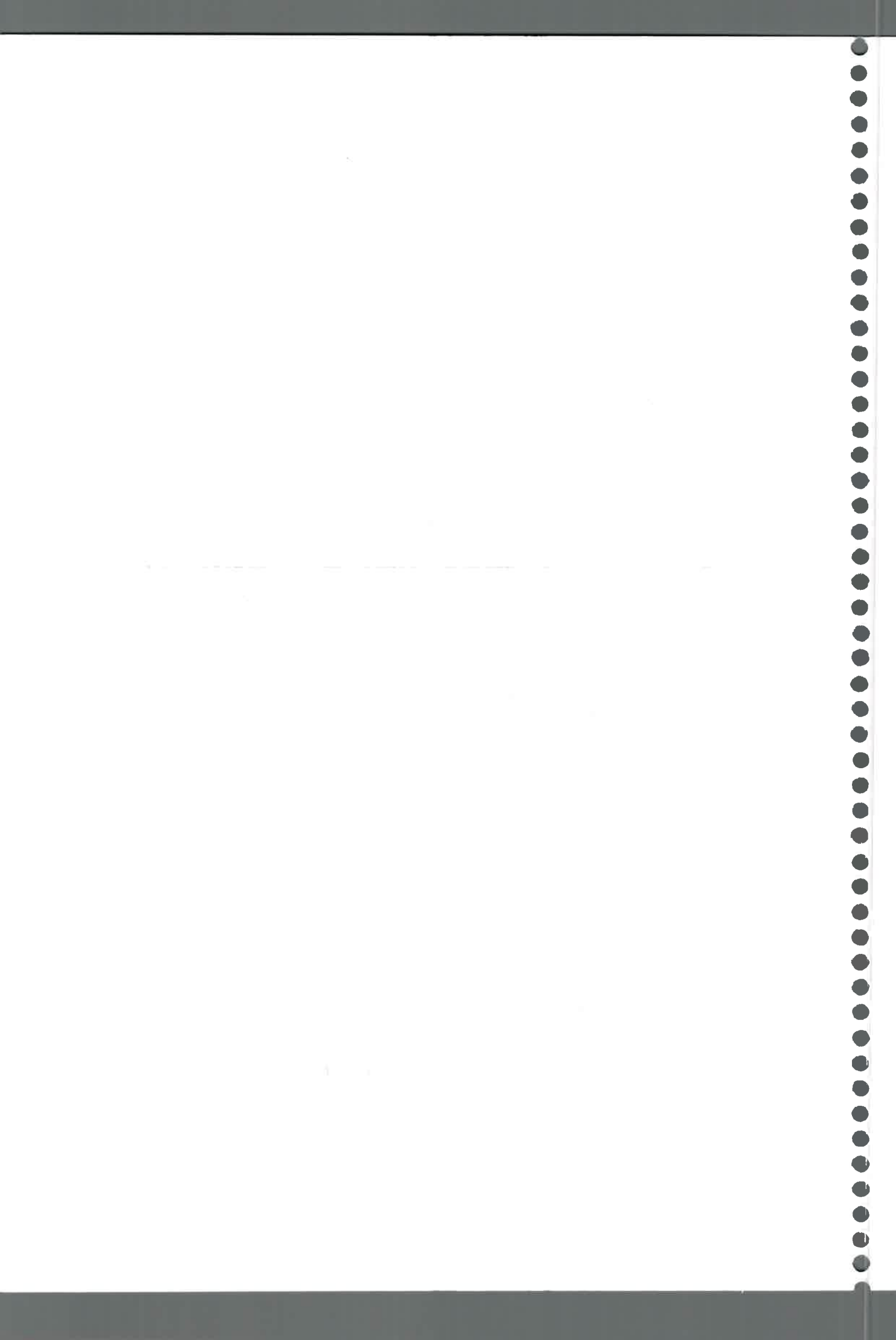


Figura 35: Dendrograma construido mediante el análisis de UPGMA de cepas aisladas de episodios clínicos en humanos y mastitis bovina ensayadas con los cebadores OLP6, OLP11 y OLP13.





d) Cepas de *S. aureus* aisladas de portadores sanos

La Figura 37 muestra los perfiles de las cepas de *S. aureus* aisladas de portadores sanos, ensayadas con el cebador OLP11. En el dendrograma de la Figura 38 se puede observar que en general las cepas aisladas de portadores presentaron pocos genotipos. Resultados similares pudieron obtenerse con los otros cebadores.

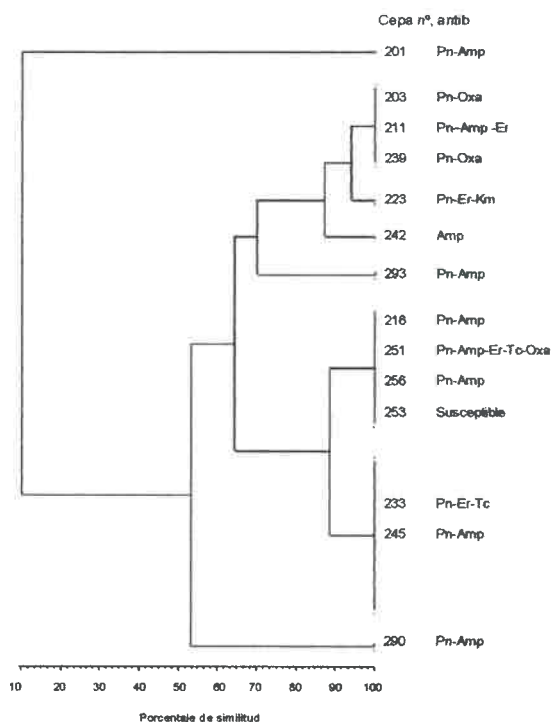


Figura 37: Dendrograma construido mediante el análisis de UPGMA de cepas aisladas de portadores ensayadas con el cebador OLP11.

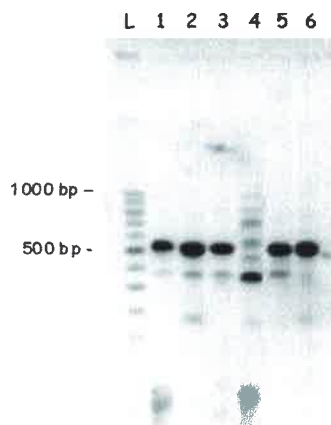
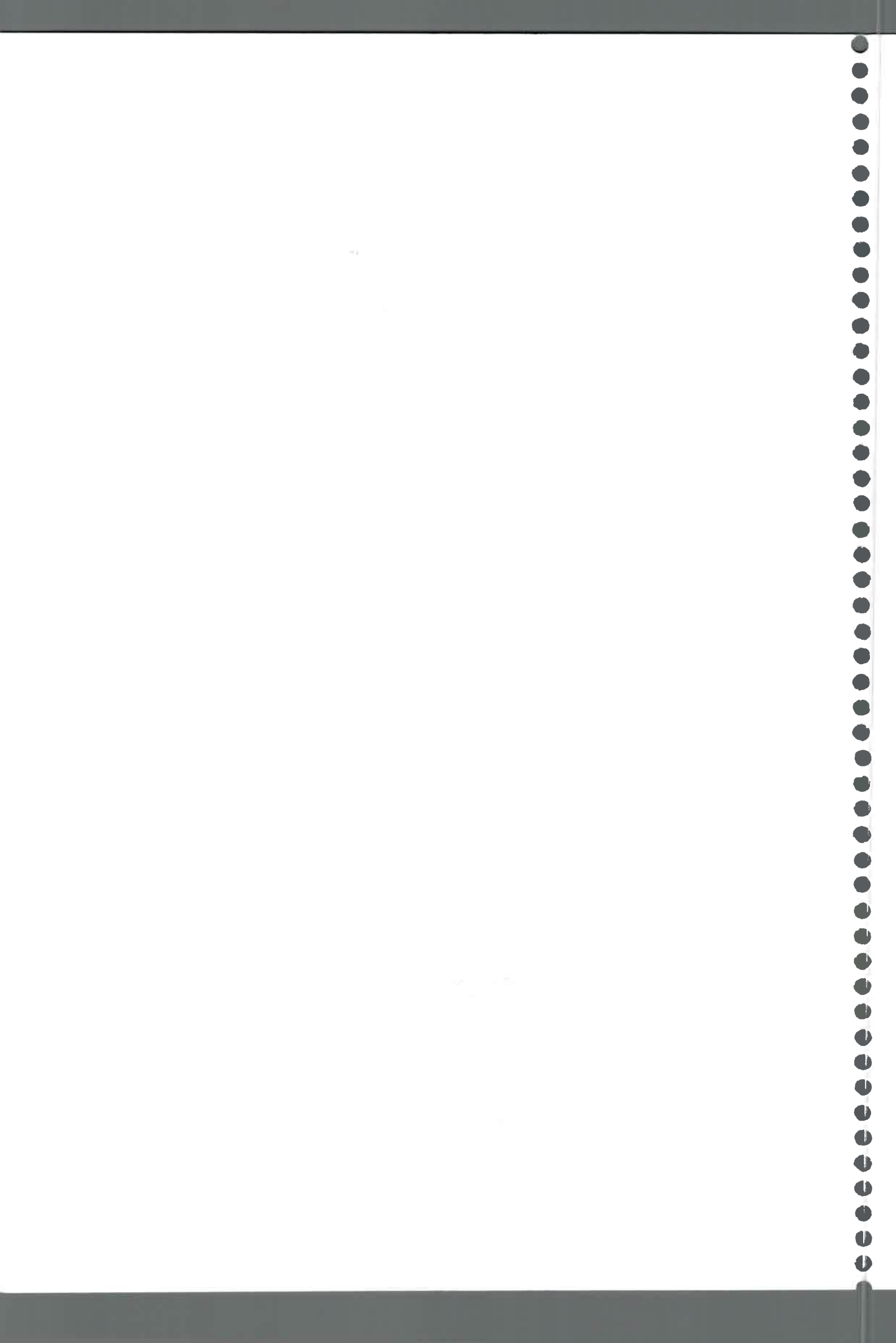


Figura 38: Perfiles de cepas de *S. aureus* aisladas de portadores ensayadas con el cebador OLP11 por RAPD-PCR. M= marcador de peso molecular 100 pb.



Al realizar el dendrograma de las cepas humanas, aisladas de episodios clínicos y de portadores ensayadas con el cebador OLP11 y OLP13 pudo observarse que no hay diferenciación entre el origen de las cepas (Figura 39).

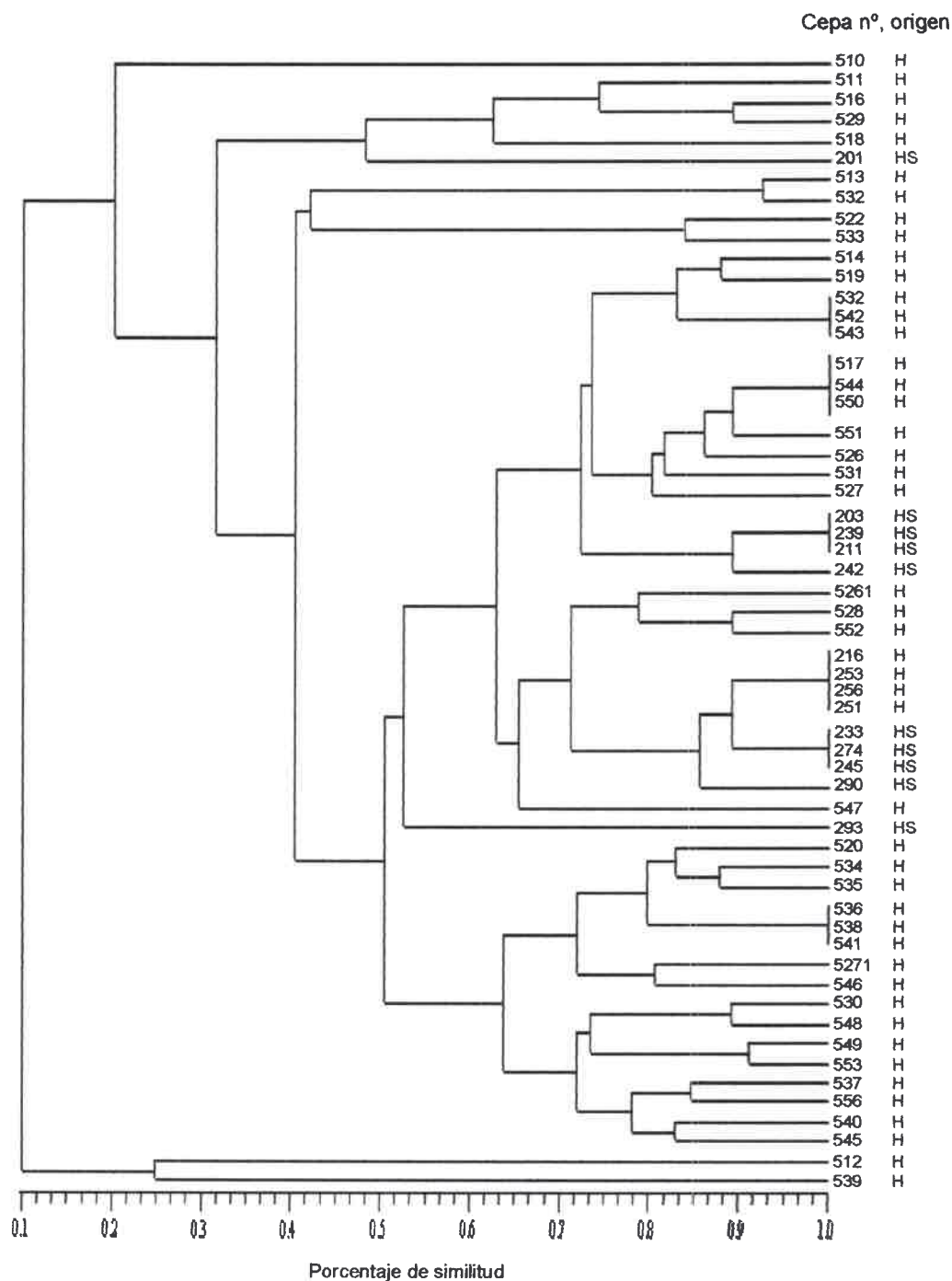


Figura 39: Dendrograma construido mediante el análisis de UPGMA de cepas aisladas de episodios clínicos y portadores mediante el análisis con los cebadores OLP11 y OLP13.



e) Cepas de *S. aureus* aisladas de alimentos

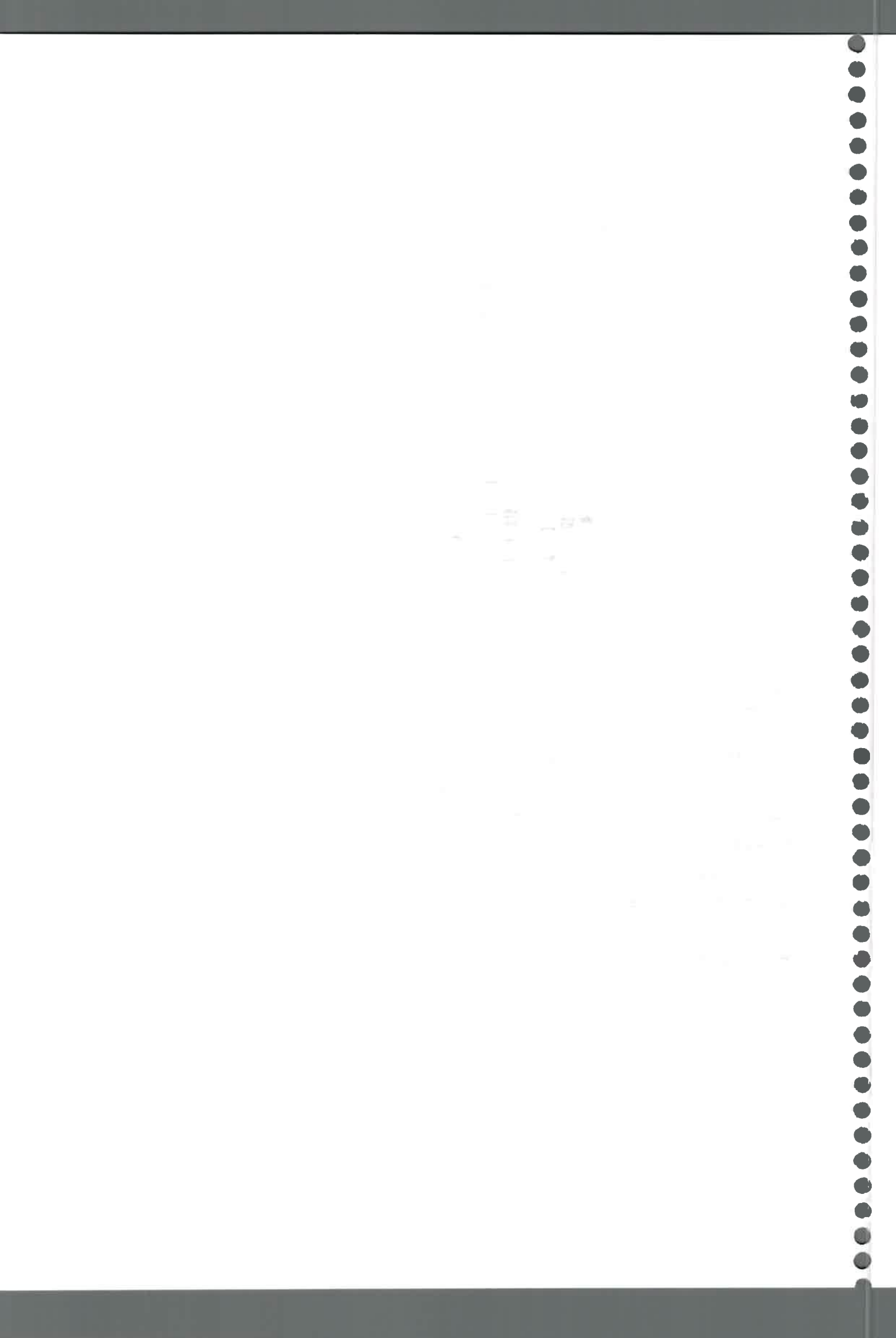
Las cepas aisladas de alimentos mostraron perfiles diferentes entre sí al del resto de las cepas analizadas. Con el cebador P11 la banda de 700 pb fue compartida por el 75% de las cepas y la de 1000 pb por el 60%. Con el P13 el 57% comparte la banda de 1000 pb, el 75% la banda de 700 y el 92% la banda de 500 pb. (Figura 40).



Figura 40: Perfiles de cepas de *S. aureus* aisladas de alimentos ensayadas por RAPD-PCR con el cebador P13.

El dendograma de las cepas ensayadas con los cebadores OLP11 y OLP13 (Figura 41) muestra que al 40% los aislados fueron divididos en varios subgrupos, encontrándose la mayoría de las cepas en el primer subgrupo. Las cepas agrupadas al 100% de similitud genética son en su mayoría aisladas de helados.

El análisis de las cepas según los distintos cebadores mostró que las mismas fueron agrupadas de manera muy similar. Los índices de discriminación calculados según Hunter-Gaston fueron semejantes para el cebador para el primer OLP11 y OLP13 (0,947 y 0,949, respectivamente).



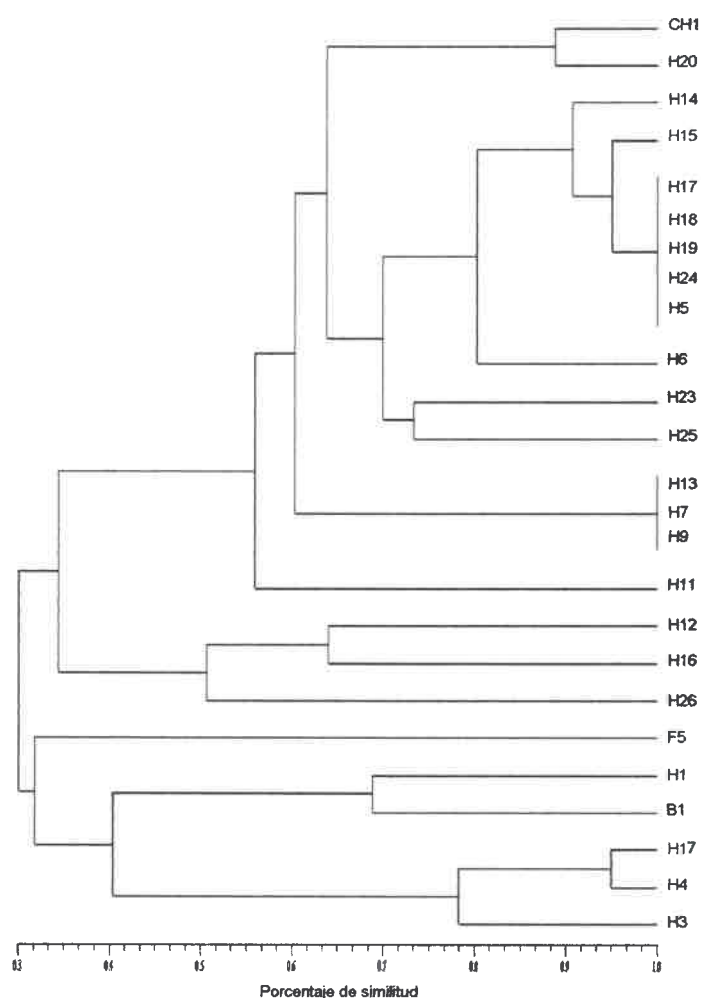


Figura 41: Dendrograma construido mediante el algoritmo de UPGMA basado en el coeficiente de Dice (S_D) obtenido luego de la comparación de ADN de cepas aisladas de alimentos mediante RAPD-PCR usando los cebadores OLP11 y OLP13.

En la Figura 42 se muestra el análisis de las cepas aisladas de alimentos y cepas relacionadas a alimentos con los cebadores OLP11 y OLP13. Puede observarse que las cepas aisladas de alimentos no se diferencian con respecto a las cepas de superficies y de operarios.



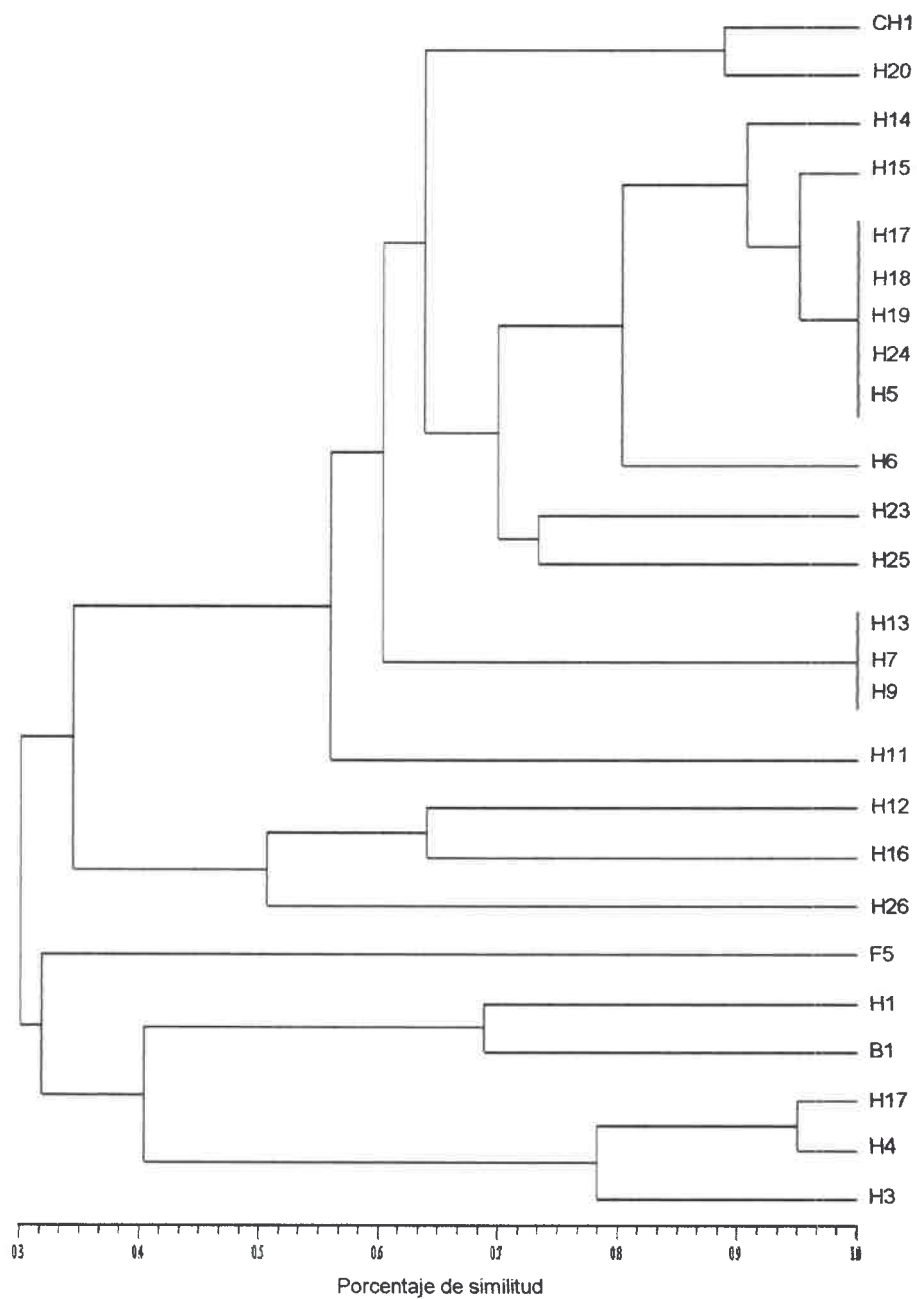


Figura 42: Dendrograma construido mediante el algoritmo d de ADN de cepas aisladas de alimentos y de superficies mediante RAPD-PCR usando los cebadores OLP11 y OLP13.



f) Cepas de *S. aureus* aisladas de huéspedes humanos, bovinos y de alimentos.

Resulta interesante destacar que las cepas aisladas de alimentos mostraron perfiles genotipos semejantes a las cepas aisladas de portadores al analizarlas con los diferentes cebadores. En el dendrograma de la Figura 43 se puede observar que las cepas se agrupan al azar, sin tener en cuenta la asociación huésped específica. Pero al realizar el análisis de coordenadas principales (Figura 44) se observan tres grupos que corresponden a las tres poblaciones ensayadas

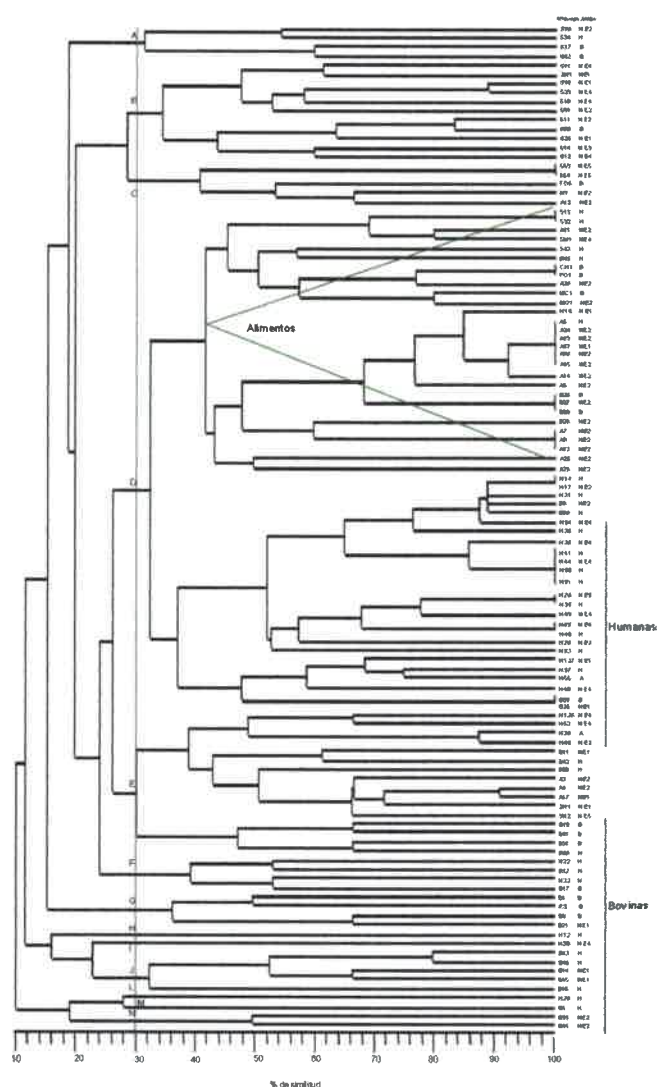
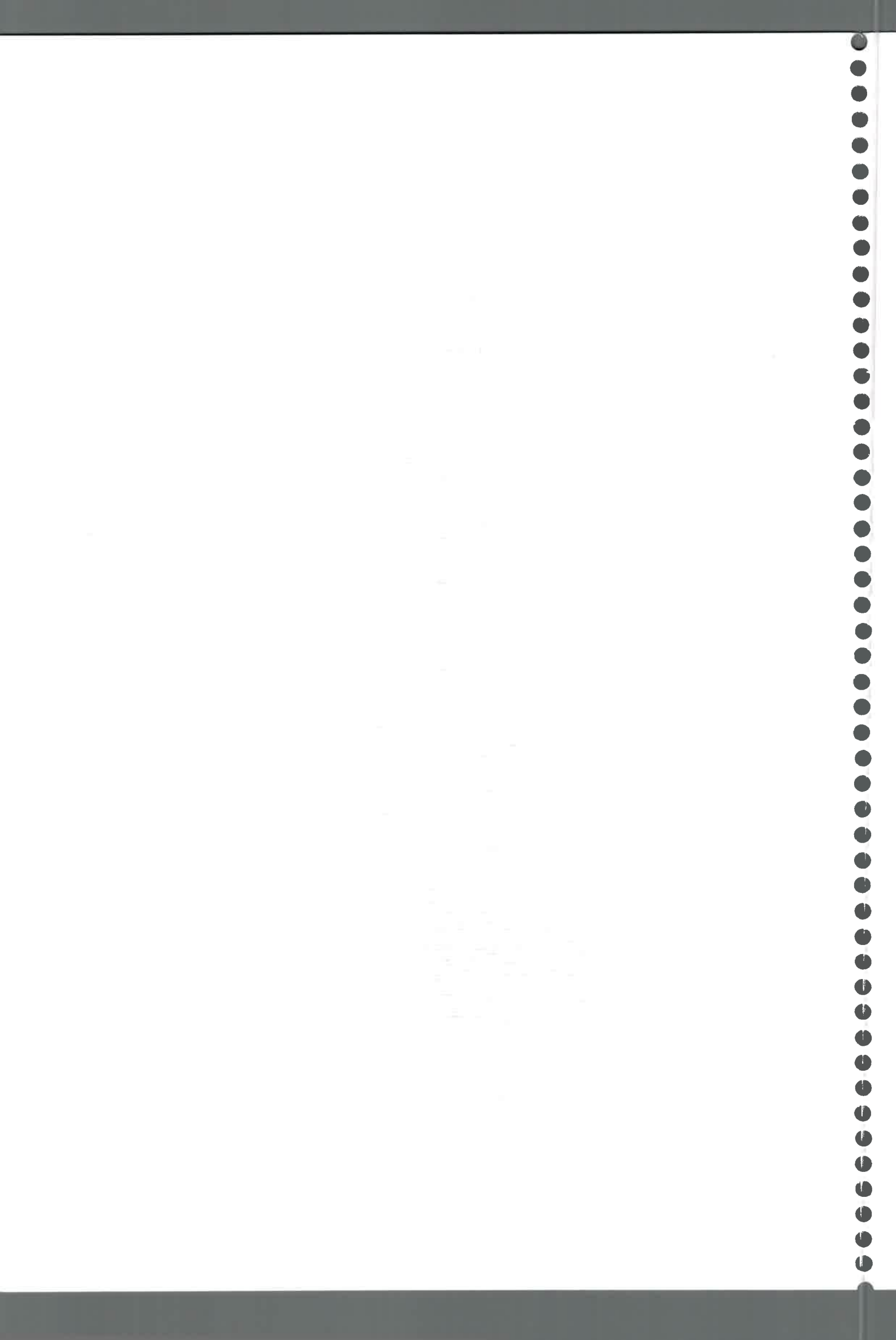


Figura 43: Dendrograma construido mediante el algoritmo de UPGMA basado en el coeficiente de Dice (S_D) obtenido luego de la comparación de ADN de cepas aisladas de huéspedes humanos, bovinos y alimentos mediante RAPD-PCR usando los cebadores P11 y P13.



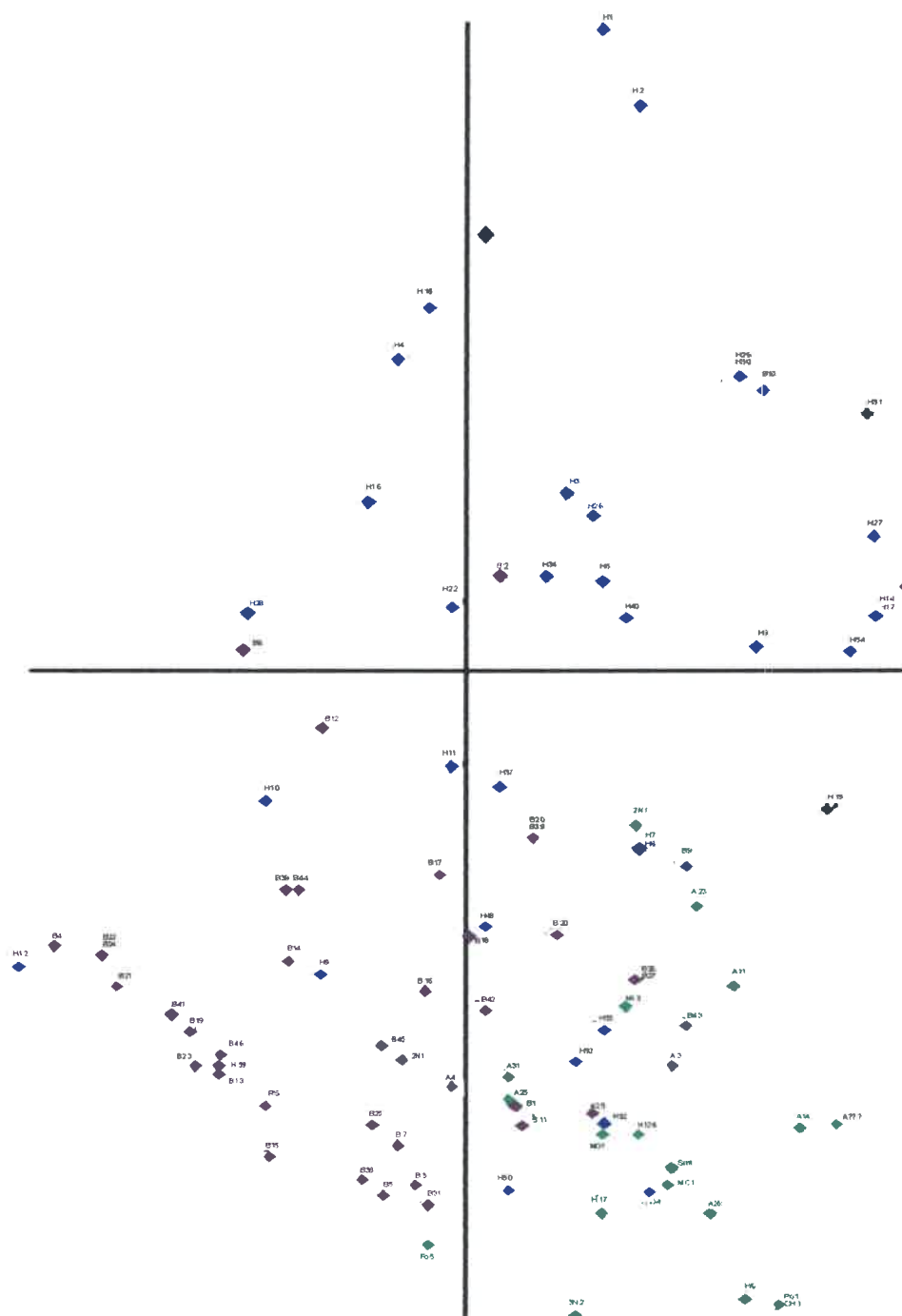
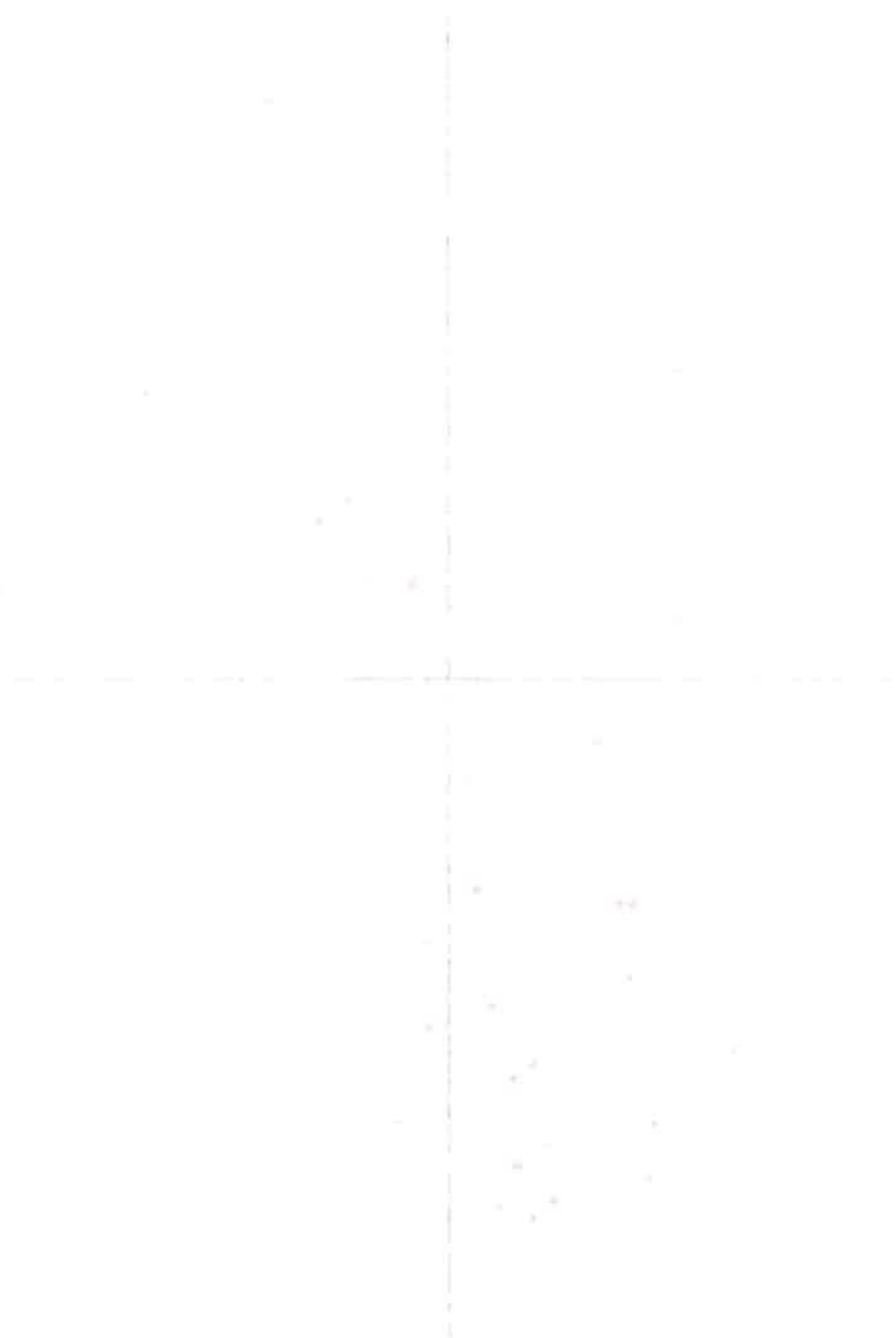


Figura 44: Análisis de coordenadas principales realizado de acuerdo a los resultados obtenidos por RAPD-PCR con los cebadores OLP11 y OLP13. (◆) cepas humanas, (◆) cepas bovinas, (◆) cepas de alimentos.



5- ANALISIS ESTADÍSTICO Y TAXONOMICO DE CEPAS DE *S. aureus* POR REP-PCR

b) Cepas de *S. aureus* aisladas de humanos

Se determinó que las cepas de *S. aureus* aisladas de humanos analizadas con el cebador RWE mostraron diferentes perfiles cuyos fragmentos variaron entre 250 y 4000 pb y el 95% compartió la banda de 350 pb (Figura 45).

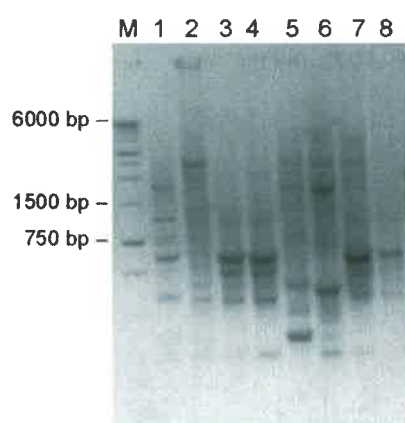
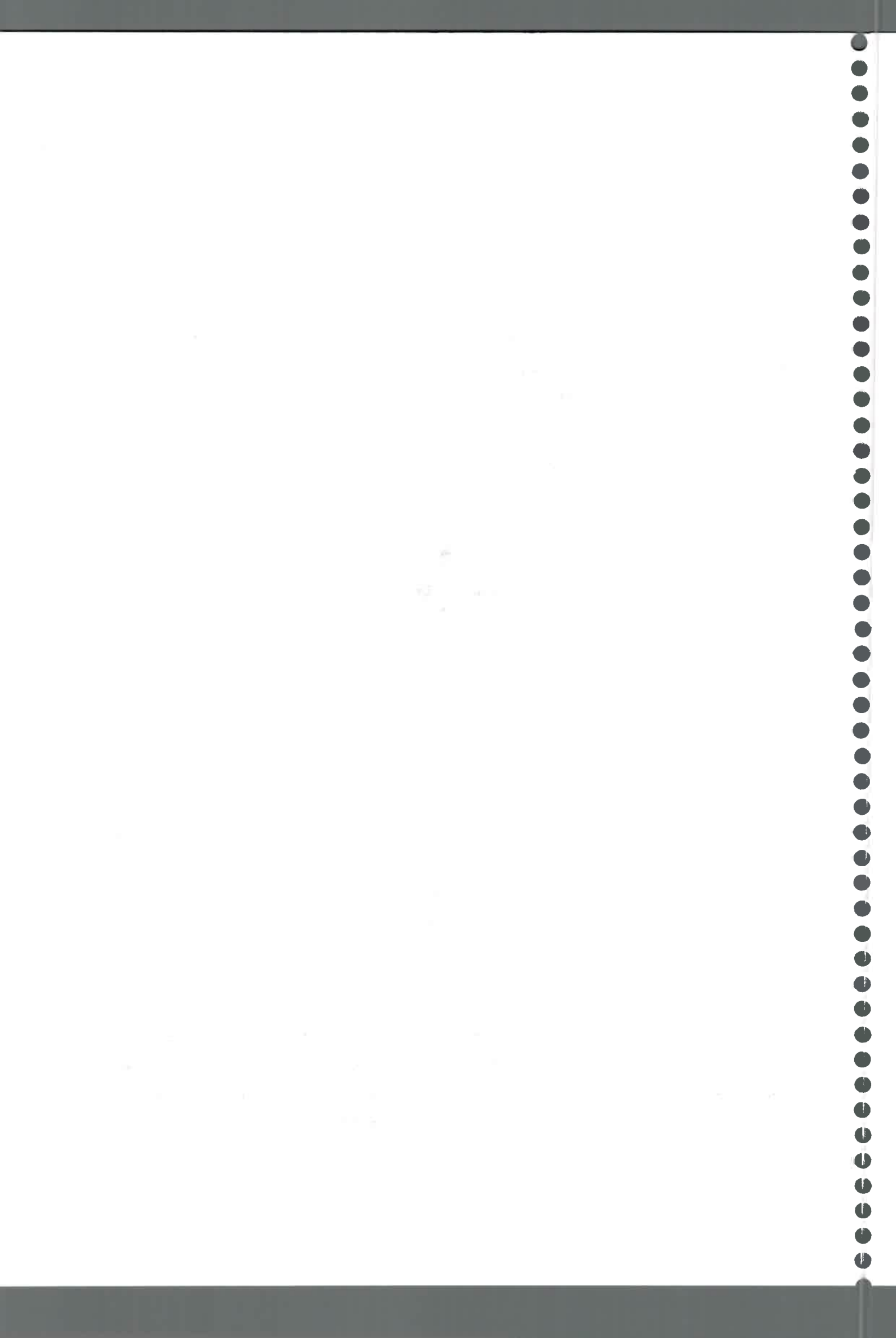


Figura 45: Perfiles de cepas de *S. aureus* ensayadas por REP-PCR. M: marcador de peso molecular de 1000 pb.

En un primer análisis de agrupamiento al 50% de similitud genética relativa las cepas se dividen en 5 grupos (A-E) (Figura 46). El cluster A agrupa 10 cepas (77%) pertenecientes a los biotipos no específicos y 7 cepas (54%) aisladas de hemocultivo, siendo todas resistentes a penicilina-ampicilina. El 77% de las cepas de este grupo son resistentes a estreptomycin. El cluster B agrupa el 82% de las cepas correspondientes al ecotipo humano.

En este primer análisis de agrupamiento pueden identificarse 2 subgrupos BI y BII. El subgrupo BI está formado por 7 cepas pertenecientes al ecotipo humano y otras 7 cepas resistentes a penicilina-ampicilina. Dentro del grupo BI al 75% de similitud genética relativa se encuentra un grupo cuyas cepas fueron aisladas de herida quirúrgica, no hubo



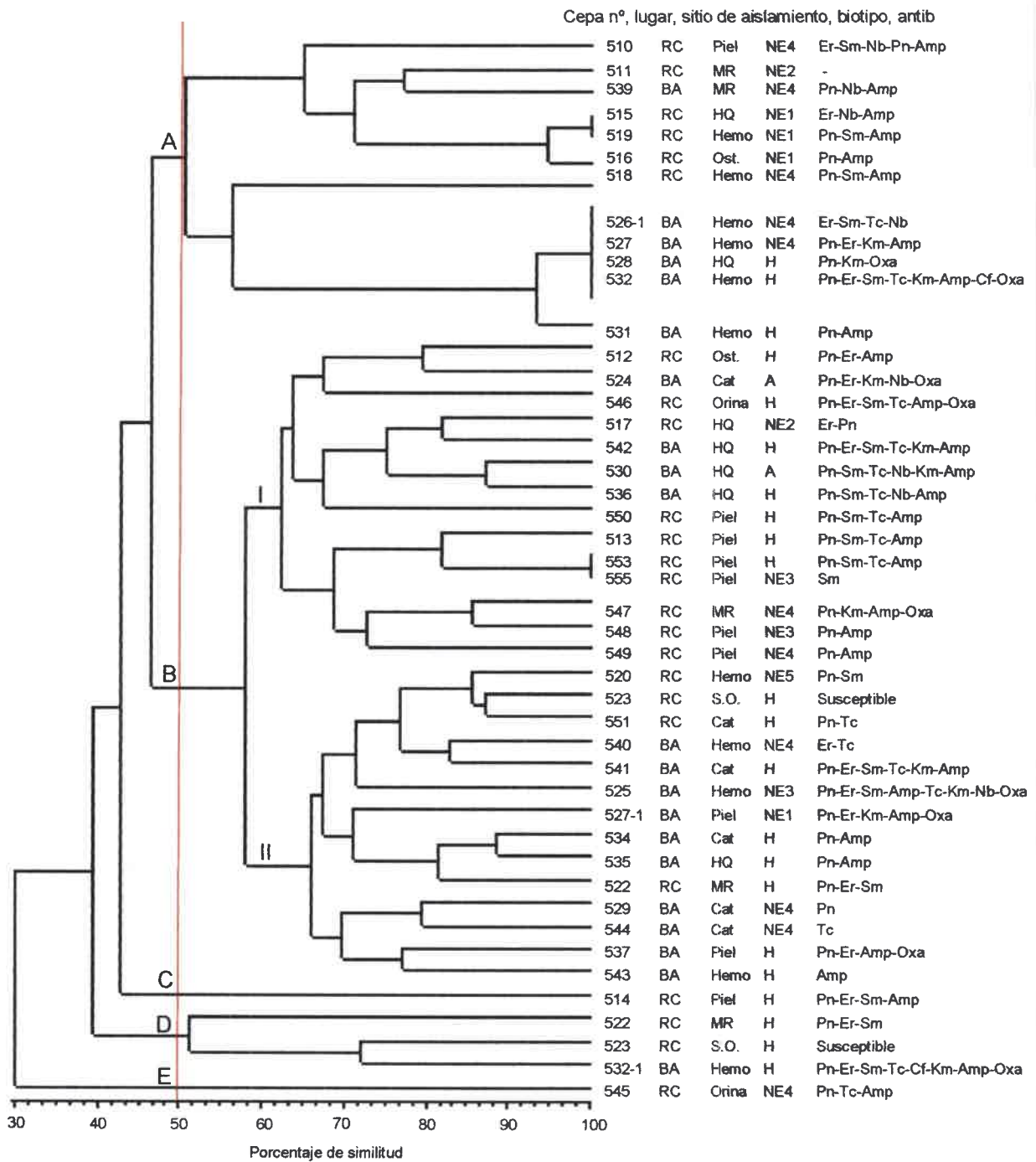
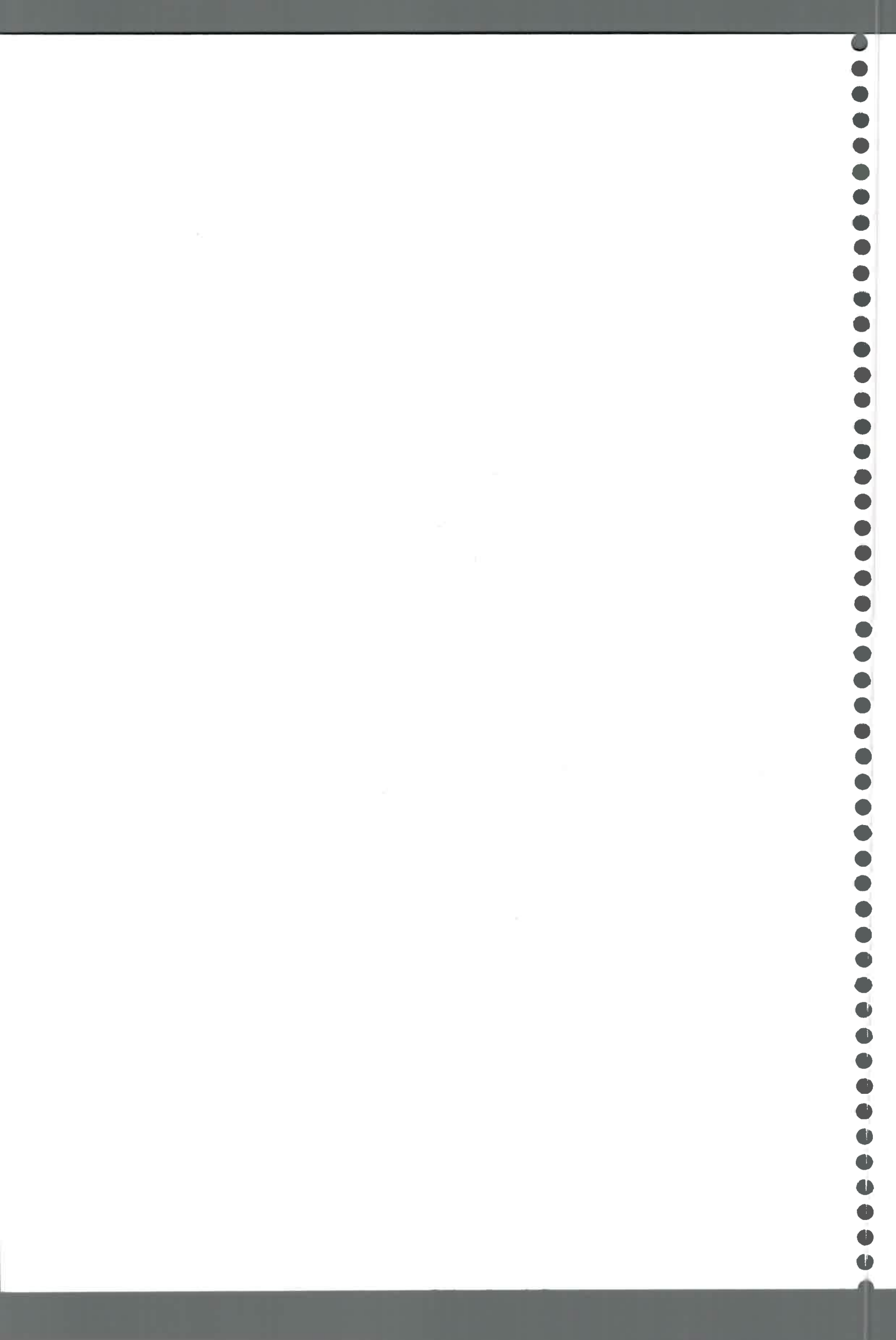


Figura 46: Dendrograma construido mediante el algoritmo de UPGMA basado en el coeficiente de Dice (S_D) obtenido luego de la comparación de ADN de cepas aisladas de huéspedes humanos de episodios clínicos mediante REP-PCR.



asociación entre sitio de infección y biotipo, pero todas son penicilina resistente y 3 tienen el perfil penicilina, estreptomicina, tetraciclina y ampicilina resistentes. El grupo BII está formado por 7 cepas pertenecientes al ecotipo humano, 5 aisladas de catéter y 4 de hemocultivos. El análisis al 80% de similitud genética relativa mostró la presencia de 30 genotipos. Según este análisis 4 aislados pertenecen al mismo genotipo y otros dos estarían epidemiológicamente relacionados. En las cepas aisladas se encontraron relaciones entre sitio de infección y genotipos, por ejemplo las cepas 517 y 542 aisladas de herida quirúrgica representarían el mismo genotipo y estarían relacionadas con las cepas 530 y 536 también aisladas de herida quirúrgica. Tres cepas aisladas de infecciones serían iguales aunque no estarían relacionadas epidemiológicamente con el resto de las cepas aisladas del mismo sitio de infección.

b) Cepas de *S. aureus* aisladas de bovinos

Se realizó el análisis molecular de las cepas de *S. aureus* aisladas de las dos regiones más importantes de la cuenca lechera argentina. La Figura 47 muestra los resultados obtenidos con el cebador REW. El número de fragmentos amplificados fue desde 1 a 9.

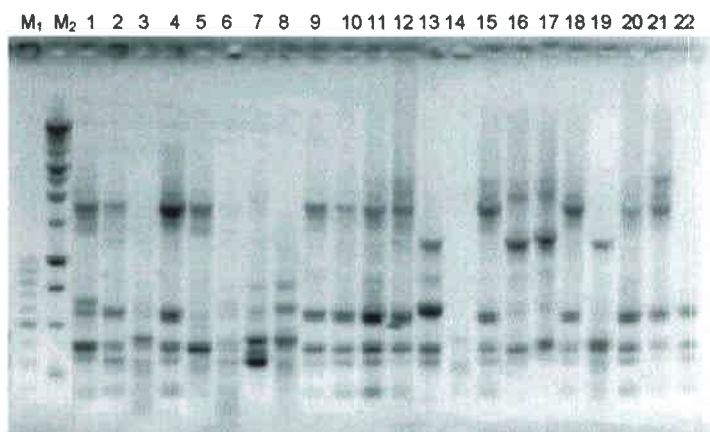
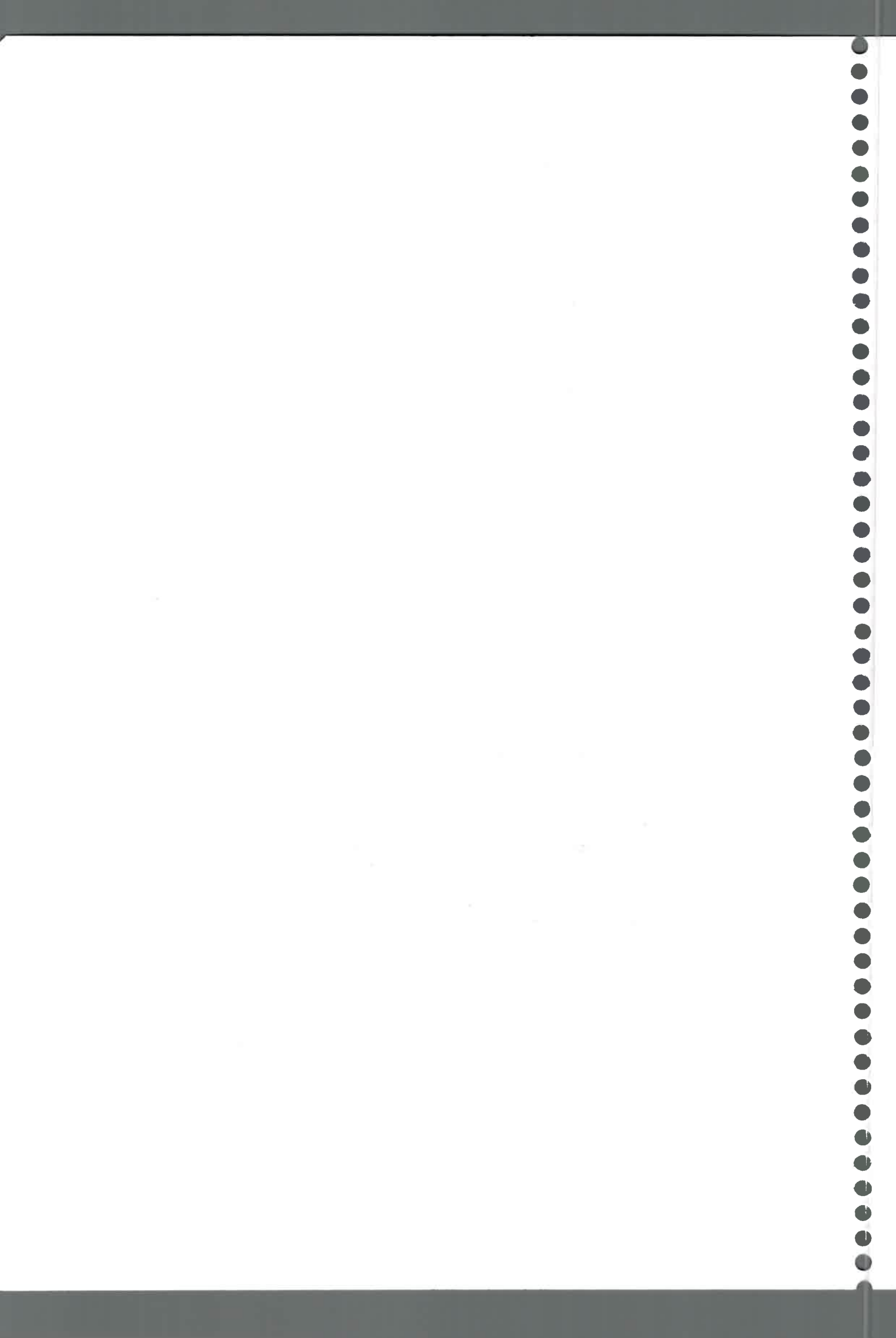


Figura 47: Perfiles de cepas de *S. aureus* aisladas de bovinos ensayadas por REP-PCR. M₁: marcador de peso molecular de 100 pb, M₂: marcador de peso molecular de 1000 pb.



Se construyó un dendrograma incluyendo todos los perfiles. Al primer nivel de similitud al 50% se definieron 6 clusters (I-VI). Es importante destacar que los genotipos de las cepas bovinas fueron divididos en grupos de acuerdo al origen de aislamiento. El cluster I agrupó el 93% de los aislados pertenecientes a la región II (Buenos Aires) y los clusters restantes agruparon a los aislados de la región I (Córdoba). Se observó también que las cepas pertenecientes al tambo D de la región I mostraron dos perfiles predominantes.

Ochenta de 24 cepas (75%) del tambo D fueron asociadas con cepas aisladas de la región de Buenos Aires (grupos A, C, D y F) y entre ellas, el grupo F agrupó el 33% de los aislados. El 60% de las cepas de *S. aureus* de la región de Buenos Aires, se agruparon en los grupos A, B y C (9%, 20% y 31% respectivamente). Las cepas aisladas del tambo A y D mostraron la mayor diversidad genética, con 11 y 12 genotipos diferentes, cada uno. También es interesante destacar la presencia de dos perfiles predominantes en el tambo D. El 37% de las cepas aisladas de este tambo pertenecían a uno de estos dos genotipos. Por otro lado, el tambo B, tuvo la menor variación genética con solo 3 genotipos diferentes. El tambo B tuvo la menor variación genética con solo 3 genotipos diferentes. Por otro lado un mismo perfil fue encontrado en ambas regiones (Figura 48). En cepas bovinas no se encontró asociación entre genotipos y perfil de antibióticos.



Figura 48: Dendrograma construido mediante el algoritmo de UPGMA basado en el coeficiente de Dice (S_D) obtenido luego de la comparación de ADN de cepas aisladas de huéspedes bovinos mediante REP-PCR.

c) Cepas de *S. aureus* aisladas de humanos y de bovinos

El dendrograma realizado muestra que en general las cepas humanas y bovinas pueden separarse de acuerdo al origen (Figura 49).

d) Cepas de *S. aureus* aisladas de portadores sanos

Las cepas aisladas de portadores mostraron pocos perfiles, pero mayor número de bandas que en el ensayo de RAPD-PCR. En la Figura 50 se pueden observar algunos de los perfiles obtenidos. En el dendrograma de la Figura 51 se observa que al 45% de similitud genética las cepas se agrupan en un solo cluster. En la Figura 52 se puede observar que las cepas aisladas de portadores se agrupan junto con las cepas aisladas de episodios clínicos, no se separan en dos grupos diferentes.

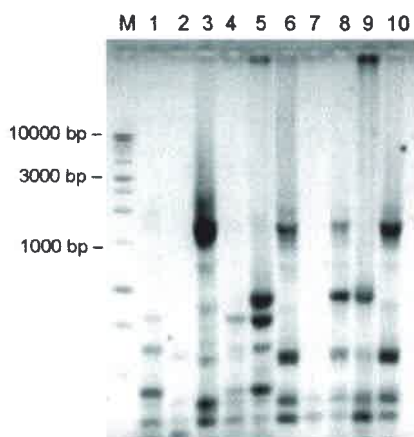


Figura 50: Perfiles de cepas de *S. aureus* de portadores ensayadas por REP-PCR. M: marcador de peso molecular de 1 kb.

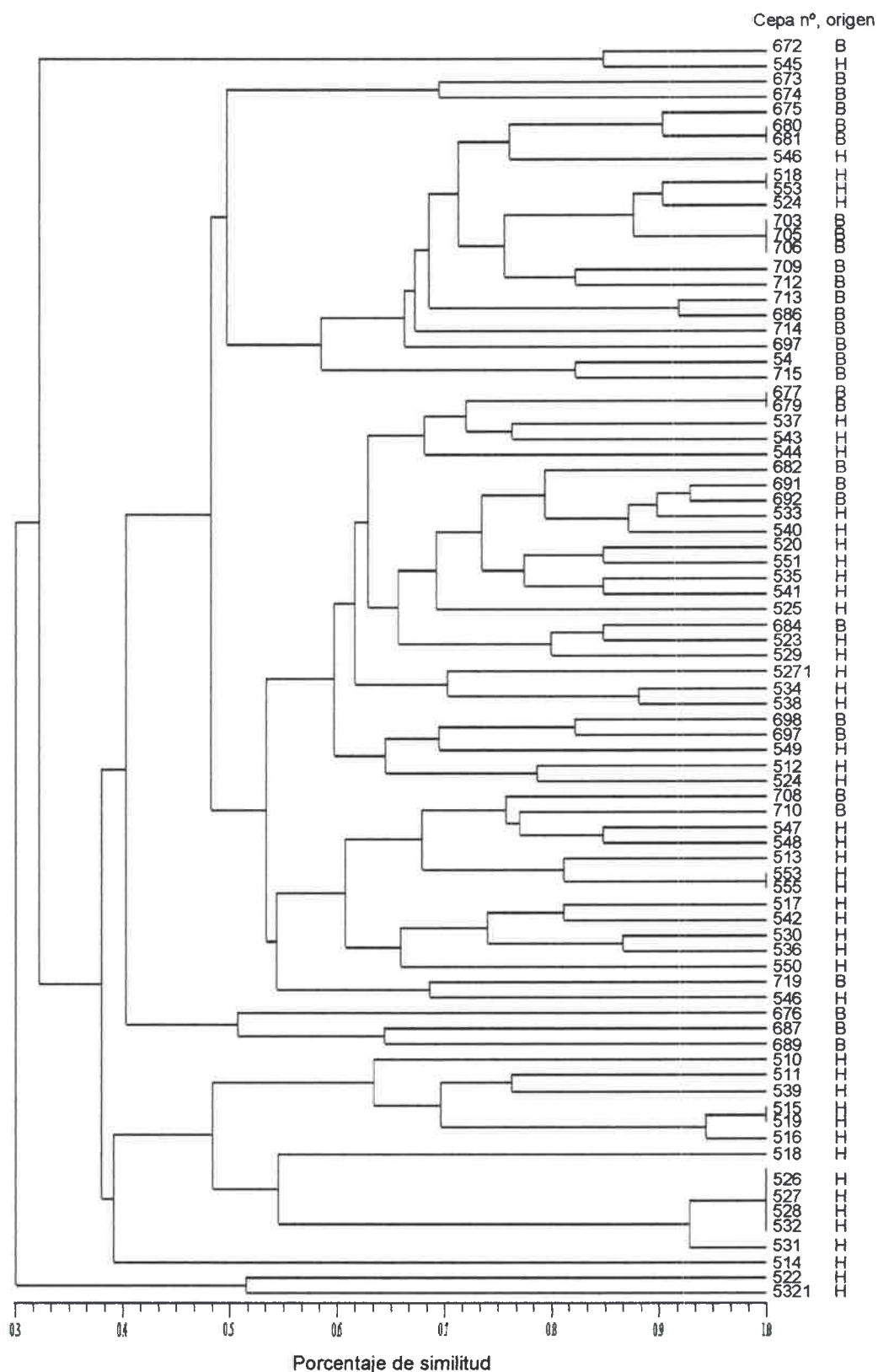


Figura 49: Dendrograma construido mediante el algoritmo de UPGMA basado en el coeficiente de Dice (S_D) obtenido luego de la comparación de ADN de cepas aisladas de huéspedes humanos de episodios clínicos y bovinos mediante REP-PCR.

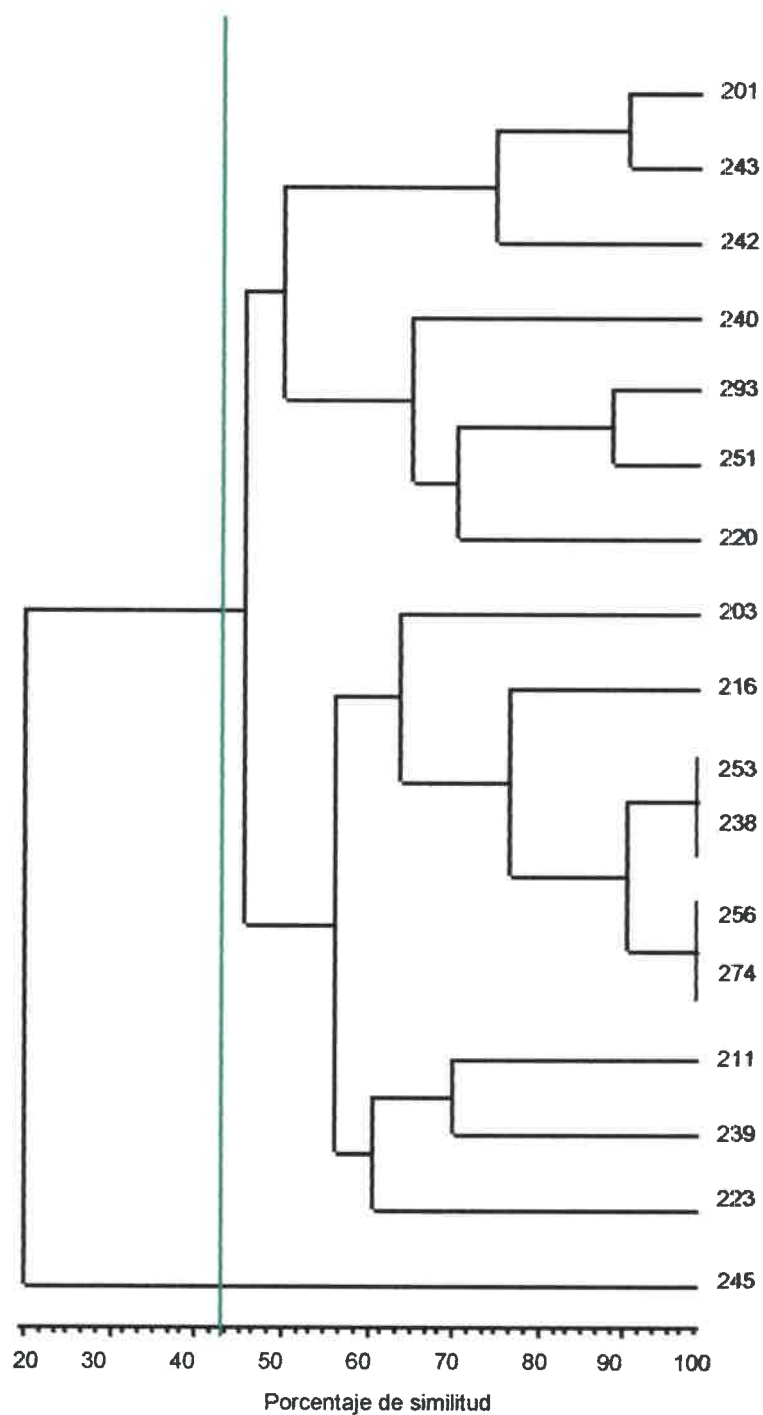


Figura 51: Dendrograma construido mediante el algoritmo de UPGMA basado en el coeficiente de Dice (S_D) obtenido luego de la comparación de ADN de cepas aisladas de portadores.



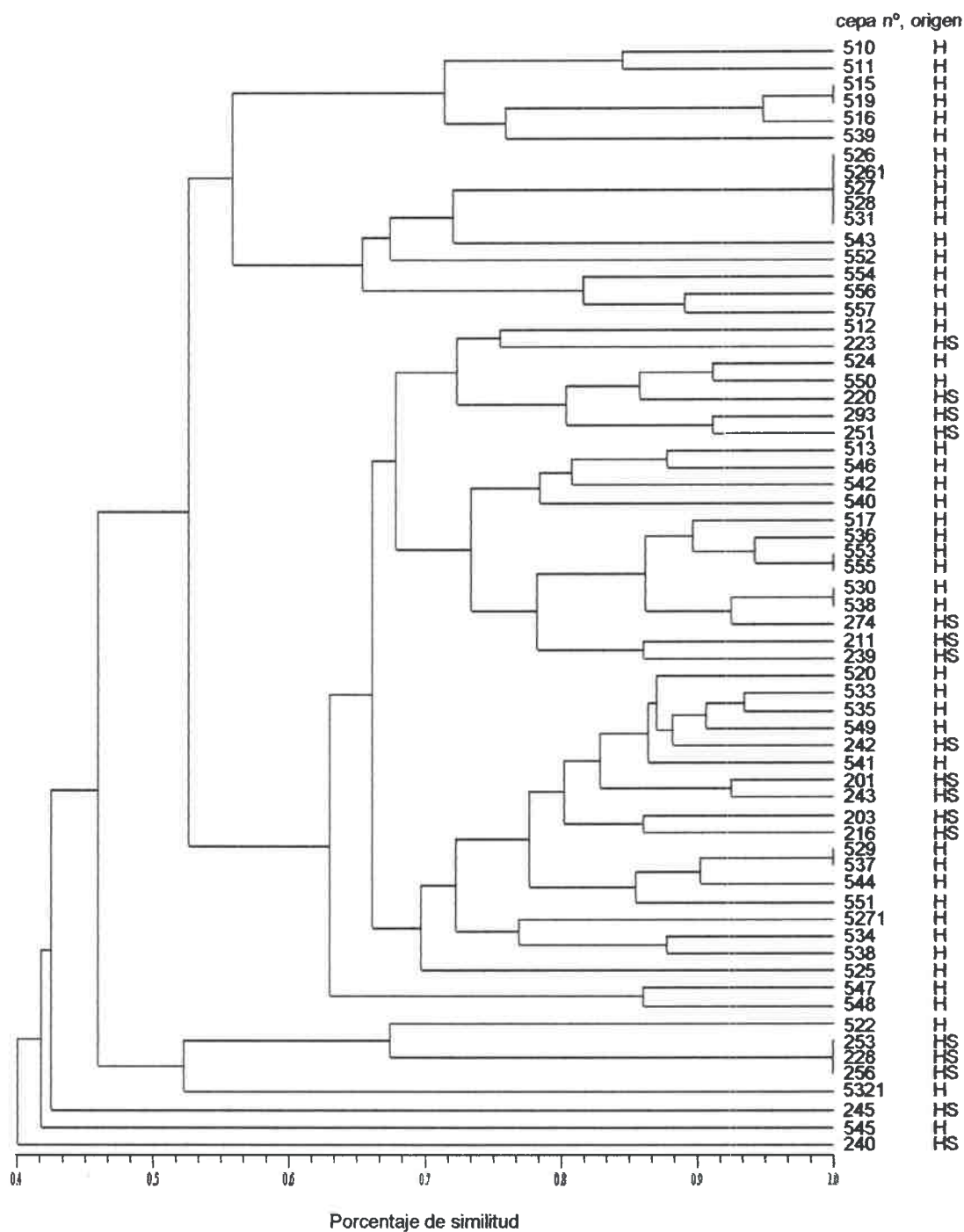


Figura 52: Dendrograma construido mediante el algoritmo de UPGMA basado en el coeficiente de Dice (S_D) obtenido luego de la comparación de ADN de cepas aisladas de portadores y de episodios clínicos.

e) Cepas de *S. aureus* aisladas de alimentos

En la Figura 53 se observan las bandas obtenidas a partir del ensayo de las cepas con la técnica de rep-PCR. En la Figura 54 se observan dichas cepas, que son genotípicamente iguales entre sí y semejantes a las cepas aisladas de portadores sanos y de episodios clínicos.

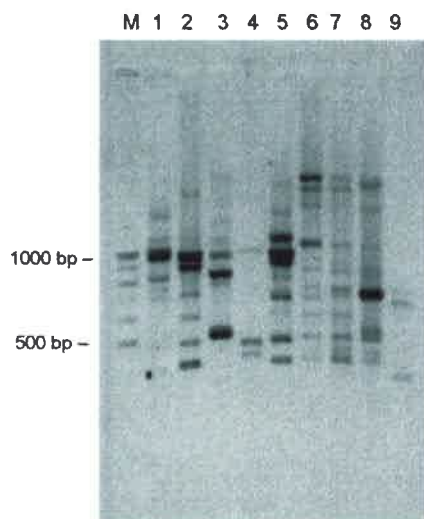


Figura 53: Perfiles de cepas de *S. aureus* de portadores ensayadas por REP-PCR. M: marcador de peso molecular de 1 kb.

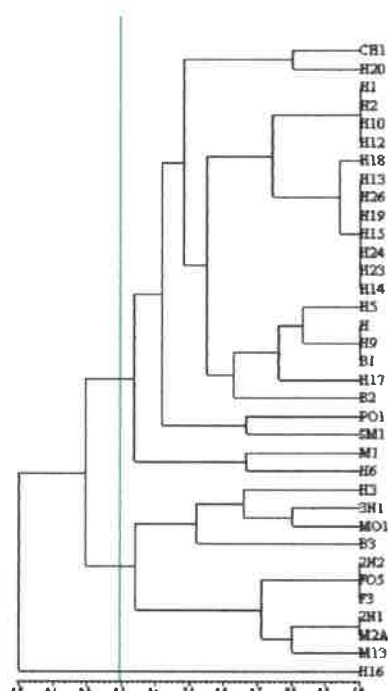


Figura 54: Dendrograma construido mediante el algoritmo de UPGMA basado en el coeficiente de Dice (S_D) obtenido luego de la comparación de ADN de cepas aisladas de alimentos.

f) Cepas de *S. aureus* aisladas de huéspedes humanos, bovinos y de alimentos.

Se observaron diferentes genotipos entre las cepas aisladas de humanos y de bovinos, agrupándose las cepas humanas con la población humana y las cepas bovinas con la población bovina. Las cepas aisladas de alimentos fueron semejantes a las cepas aisladas de portadores sanos y de episodios clínicos.

El poder de discriminación de la técnica de rep-PCR fue de 0.98.

6- BUSQUEDA DE MARCADORES MOLECULARES MEDIANTE MEZCLAS DE ADN

Al observar bandas compartidas en cada una de las poblaciones ensayadas, tanto en la técnica de RAPD-PCR y REP-PCR, se decidió realizar el análisis de mezclas de ADN. El propósito de dicho análisis fue encontrar posibles perfiles de bandas compartidas para la búsqueda de marcadores moleculares.

El análisis de mezclas de ADN con el cebador OLP13 mostró un perfil de bandas comunes entre las cepas patógenas, tanto humanas como bovinas aisladas de casos clínicos (Figura 55). Las cepas de casos clínicos compartieron 5 bandas de 9 totales (55%) y las cepas de origen bovino aisladas de leche compartieron 3 bandas de 8 totales (37%). Las cepas bovinas de casos no clínicos mostraron tres bandas comunes, de 1400, 1300 y 600 pb, en cambio las cepas bovinas y humanas de casos clínicos mostraron en común las bandas de 2000, 1800, 1500, 1000 y 900 pb. Estas bandas comunes presentes en cepas patógenas, tanto humanas como bovinas, podrían ser usadas como posibles marcadores genéticos de virulencia.

Se considera que el criterio a tener en cuenta para seleccionar un marcador es que la banda a elegir debe ser nítida, fácil de reconocer y encontrarse en un alto porcentaje en las cepas ensayadas. Las bandas ambiguas no son útiles como marcadores genéticos (Caetano-Annoles y Gresshoff, 1998).

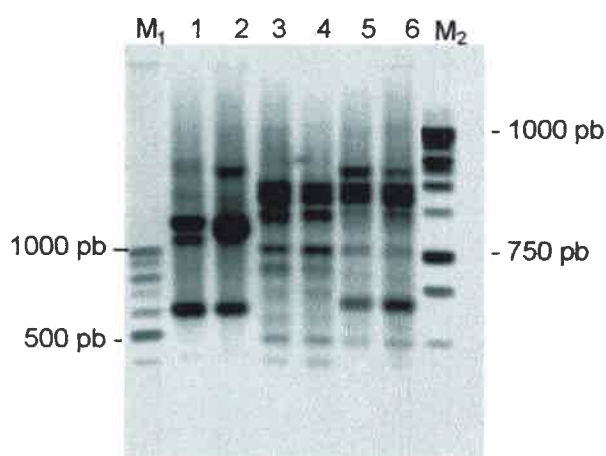


Figura 55: RAPD-PCR a partir de mezclas de ADN. Calles 1 y 2: mezclas de ADN de cepas bovinas de casos no clínicos; 3 y 4: mezclas de ADN de cepas bovinas de casos clínicos; 5 y 6 mezclas de ADN de cepas humanas de casos clínicos. M_1 : marcador de peso molecular de 100 pb, M_2 : marcador de peso molecular de 1000 pb.

El dendrograma realizado a partir de los datos corrobora la observación visual. Se observa una gran diferencia entre las mezclas de ADN de cepas aisladas de casos clínicos versus las mezclas de ADN de cepas aisladas de casos no clínicos (Coeficiente de Dice= 0.80) (Figura 56). El análisis de mezclas de ADN fue realizado con otros cebadores, pero por RAPD-PC no mostró resultados similares, sí al ensayar las mezclas por REP-PCR (datos no analizados).

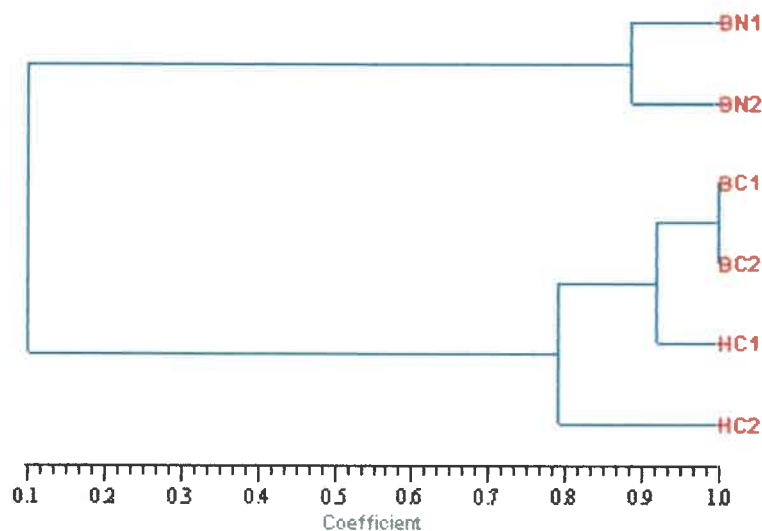


Figura 56: Dendrograma construido mediante el algoritmo de UPGMA basado en el coeficiente de Dice (S_D) obtenido luego de la comparación de perfiles de mezclas de ADN de cepas humanas de casos clínicos y mezclas de ADN de cepas bovinas aisladas de leche mediante RAPD-PCR usando el cebador OLP13. BN: Bovinas no clínicas; BC: bovinas clínicas; HC: humanas clínicas.

10/10/10
10/10/10
10/10/10
10/10/10
10/10/10

Se continuó ensayando mezclas de ADN con el propósito de encontrar posibles bandas compartidas como marcadores moleculares de origen humano y bovino. Se realizó otro experimento mezclando ADN de cepas humanas y ADN de cepas bovinas. Los ADN fueron ensayadas con el cebador OLP13 mediante la técnica de RAPD-PCR. En la Figura 57 se pueden observar dos bandas fuertes en los aislados de bovinos, de aproximadamente 1300 y 600 pb, las cuales podrían ser marcadores de origen.

Las mismas mezclas fueron ensayadas por REP-PCR y se confirmaron los resultados obtenidos anteriormente (Figura 58).

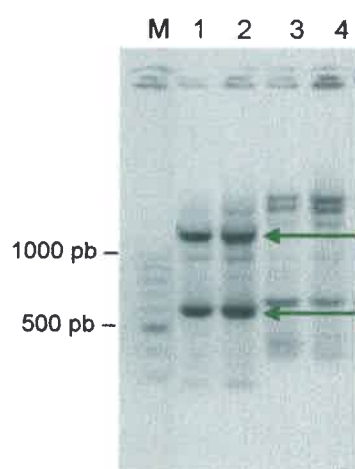


Figura 57: RAPD-PCR de mezclas de ADN de *S. aureus* a partir de mezclas. Calles 1 y 2: mezcla de cepas bovinas, Calles 3 y 4: mezclas de cepas humanas. M: marcador de peso molecular de 100 pb.

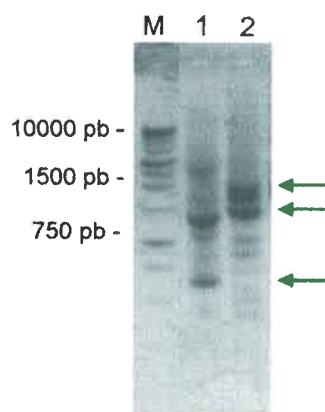
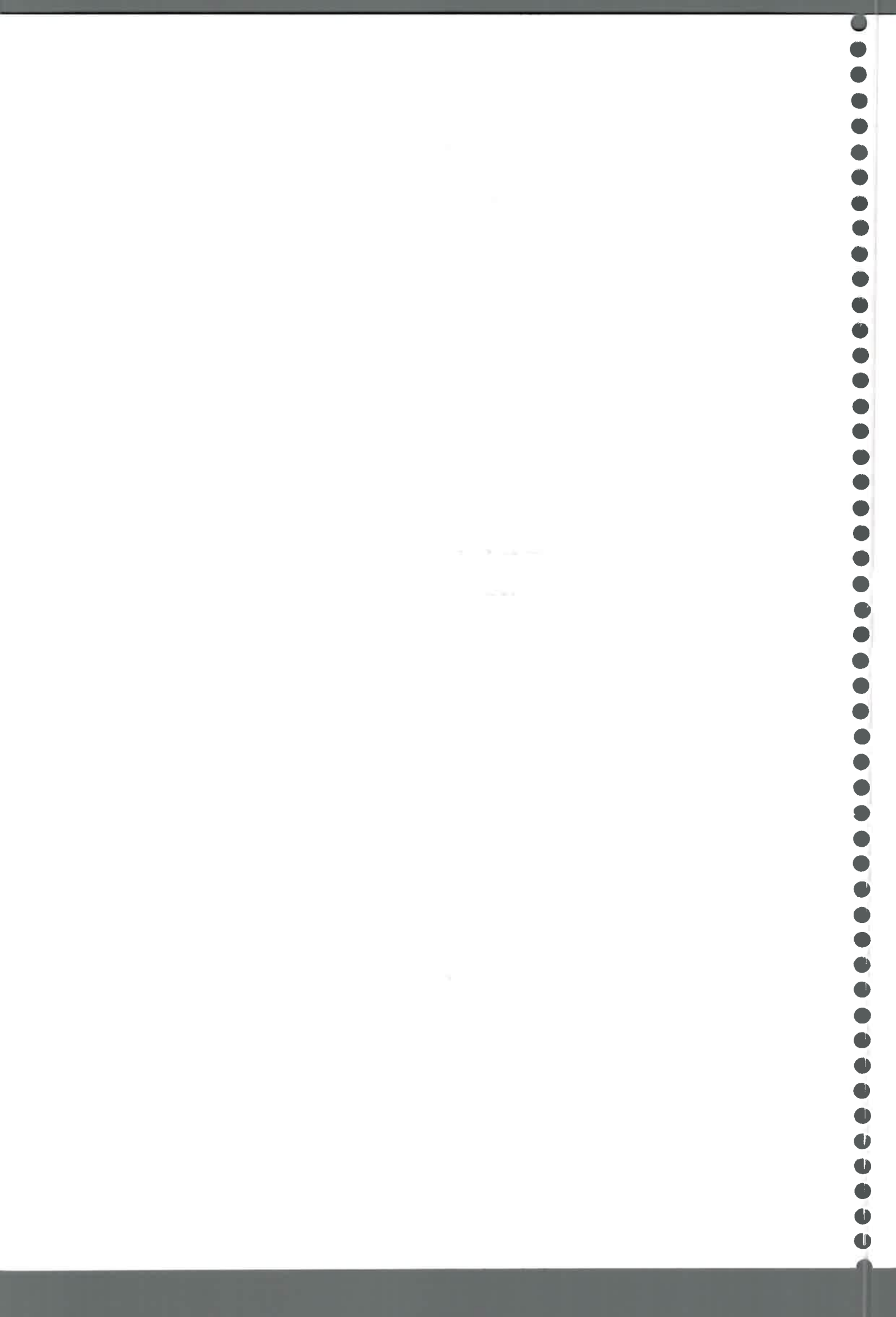


Figura 58: REP-PCR de mezclas de ADN de *S. aureus* a partir de mezclas. Calle 1: mezcla de cepas bovinas, Calle 2: mezclas de cepas humanas. M: marcador de peso molecular de 1kb.



Por otro lado se ensayaron mezclas de ADN con el propósito de encontrar posibles bandas compartidas como marcadores moleculares asociados a virulencia. En la Figura 59 se pueden observar perfiles diferentes entre cepas no patógenas y patógenas.

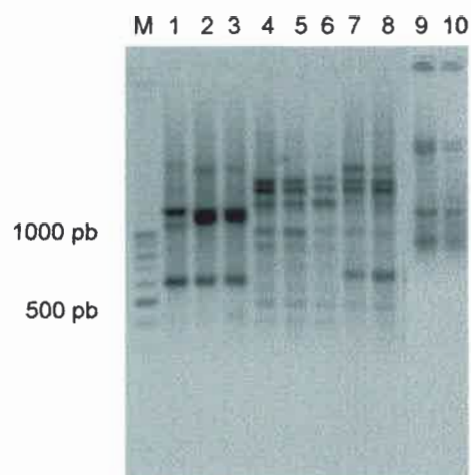


Figura 59: RAPD-PCR de mezclas de ADN de *S. aureus* a partir de mezclas. Calles 1-3: mezclas de ADN de cepas bovinas de casos no clínicos. Calles 4-6: mezclas de ADN de cepas bovinas de episodios clínicos. Calles 7 y 8: mezclas de cepas humanas de episodios clínicos. Calles 9 y 10: mezclas de cepas aisladas de humanos sanos. M: marcador de peso molecular de 100 pb.

7-OPTIMIZACION DE LA TÉCNICA DE PFGE

Para la puesta a punto de la técnica de PFGE, se probaron distintas condiciones de corrida con el objetivo de lograr una mejor resolución de los fragmentos de restricción. En la Figura 60 se muestra una corrida de PFGE en donde se observan los patrones de restricción con la enzima *Sma I*. Se analizaron dos cepas de *S. aureus* de origen bovino, RC108 y RC122.

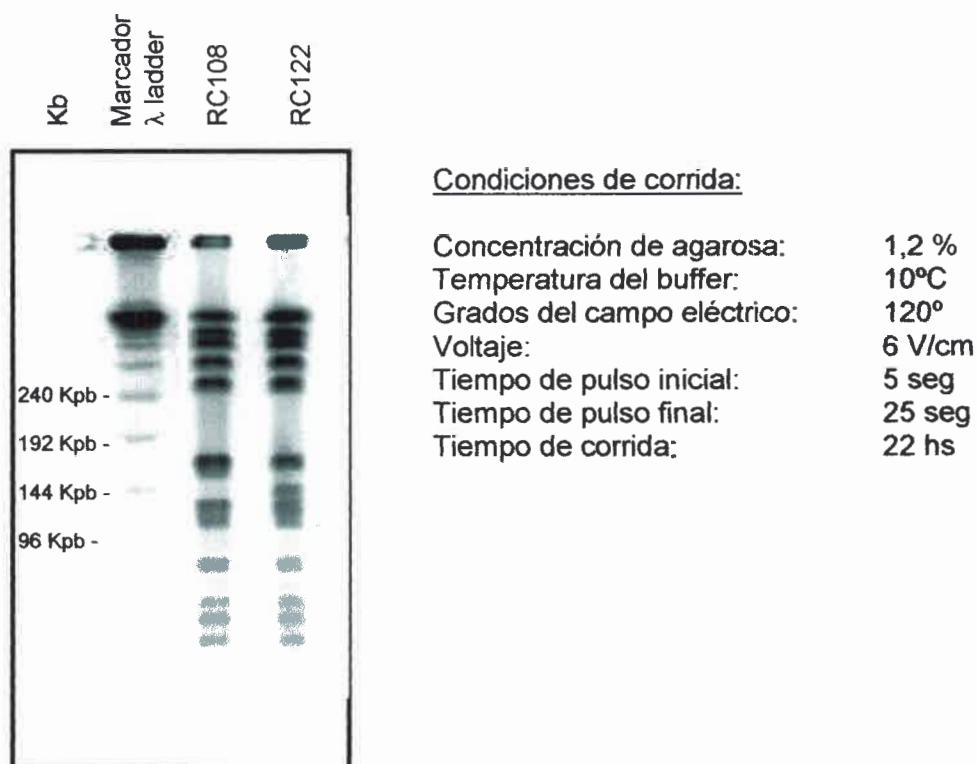


Figura 60: Perfiles de cepas de *S. aureus* ensayados por PFGE originados por digestión con la enzima *Sma I*.

Se realizó el análisis de la técnica de PFGE en cepas cuyos perfiles fueron semejantes a las técnicas analizadas anteriormente. La puesta a punto del método de PFGE, permitió el análisis de 5 cepas aisladas de bovinos con mastitis y de humana de casos clínicos. La Figura 61 muestra que las cepas analizadas comparten las cuatro primeras bandas de aproximadamente 530, 470, 430 y 380 Kpb.

Las cepas bovinas, aisladas de caso no clínico y de mastitis, comparten una banda de aproximadamente 100 Kpb.

Se observa que las cepas humanas aisladas de casos clínicos tienen un perfil semejante a las cepas bovinas productoras de mastitis.

Estos resultados confirmaron aquellos obtenidos por RAPD-PCR y REP-PCR.

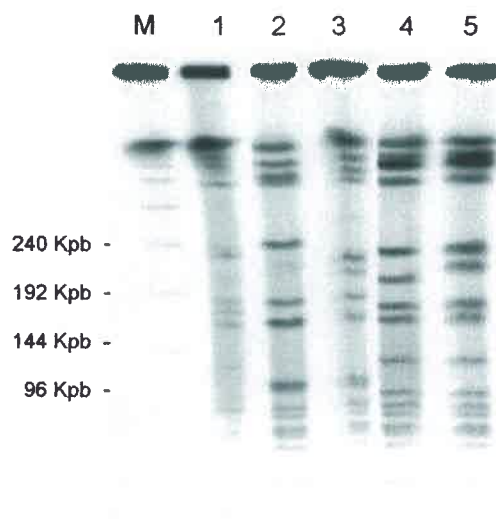


Figura 61: Perfiles de cepas de *S. aureus* ensayadas por PFGE. Calle 1: cepa bovina aislada de caso no clínico; Calles 2 y 3: cepas humanas aisladas de casos clínicos; Calles 4 y 5: cepas bovinas aisladas de casos clínicos. M: marcador de peso molecular, concatémeros de fago λ .

8- ANÁLISIS MOLECULAR DE GENES RELACIONADOS A VIRULENCIA

Con el fin de analizar epidemiológicamente la distribución de los genes asociados a virulencia en las cepas aisladas de distintos orígenes, se determinó la presencia y polimorfismos mediante amplificación por la técnica de PCR. Los genes estudiados fueron *spaA* (región IgG y región X), *coa*, *clfA*, *cna*, tipo de cápsula (*CAP 5* y *CAP 8*) y los genes reguladores *agr*, *hld* y *sae*. Dichos genes fueron determinados en 46 cepas (20%) del total de aislados. En la Tabla 20 se muestran las características de cada cepa ensayada

a) Determinación de polimorfismos

i) Gen *spaA*

La amplificación del gen *spaA*, con los cebadores *spa1* y *spa4* en las cepas de *S. aureus* reveló 4 perfiles. En las cepas aisladas de humanos se observaron diferentes tamaños en los fragmentos obtenidos (de 800 pb a 1200 pb), en cambio en las cepas aisladas de huéspedes bovinos mostraron idénticos tamaños de aproximadamente 1200 pb. La amplificación de la región IgG, región de unión a inmunoglobulinas, reveló que el 91% de las cepas ensayadas mostró una banda de 900 pb, la cual indica que dichas cepas presentan 5

Faint, illegible text at the top of the page.

Faint, illegible text below the first line.

Faint, illegible text at the bottom of the page.

unidades repetidas. El resto de las cepas (9%) mostró una banda de 700 pb indicando que estas cepas poseen solo 4 unidades repetidas (Figura 62). La amplificación de la región variable X reveló que las cepas aisladas de huéspedes humanos tienen fragmentos de diferentes tamaños y por lo tanto diferente número de unidades repetidas. El polimorfismo de la región varió en tamaño de 2 a 12 unidades repetidas. Por otro lado, las cepas aisladas de bovinos mostraron fragmentos de 300 pb, 250 pb, 280 pb y 150 pb siendo el número calculado de unidades repetidas de 10, 9, 8 y 4, respectivamente. El 80% de las cepas bovinas mostraron fragmentos de 300 pb y 280 pb indicando que poseen 10 y 9 unidades repetidas. El 86% de los aislados de alimentos mostró fragmentos de 300 pb y 315 pb indicando que dichas cepas poseen 10 y 11 unidades repetidas. Solo una cepa mostró un fragmento de amplificación de 100 pb (Figura 63).

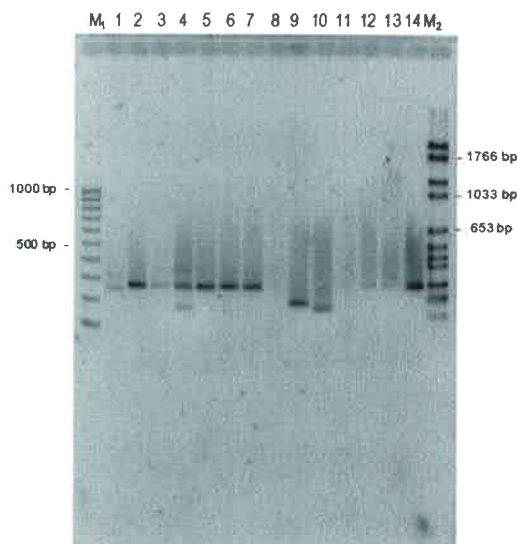


Figura 62: Productos de amplificación obtenidos a partir de la amplificación del gen *spaA* con los cebadores *spa1* y *spa2*. M₁: marcador de peso molecular 100 bp. M₂: marcador de peso molecular 1000 bp.

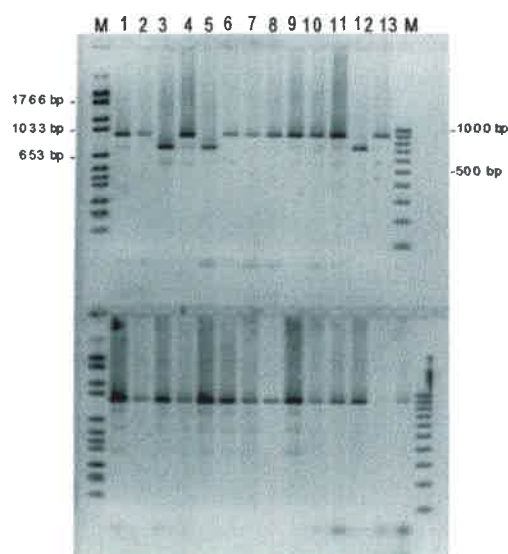


Figura 63: Productos de amplificación del gen *spaA* región X en cepas de *S. aureus*. M: marcador de peso molecular 100 y 1000 bp.

b) Gen *coa*

Los productos de amplificación de las secuencias repetidas del gen *coa* fueron caracterizadas por el tamaño de los productos amplificados. En los distintos ensayos se obtuvieron más de una banda amplificada por cepa. En general se observaron polimorfismos en todas las cepas ensayadas. Se identificaron un total de 8 perfiles diferentes. Las cepas de origen humano mostraron diferentes polimorfismos con 1, 2, 4, 5, 6 y 8 unidades repetidas. El 62% de las cepas humanas presentaron una banda de 700 pb, 5 unidades repetidas, la cual no se encontró en ninguna de las cepas aisladas de huésped bovino ni en alimentos. Solo en una cepa (H321) se obtuvo un producto de amplificación de 400 pb. Las cepas aisladas de portadores nasales mostraron 7 unidades repetidas. Las cepas aisladas de bovinos mostraron regiones polimórficas de 1, 2, 3, 4, 7 y 8 unidades repetidas. El perfil *coa* predominante fue de 4 unidades repetidas, correspondiendo a una banda de 900 pb, la cual se encontró en el 40% de las cepas. Ninguna de las cepas bovinas mostró 5 unidades repetidas. El 57% de las cepas aisladas de alimentos mostró tener 4 unidades repetidas (Figura 64).

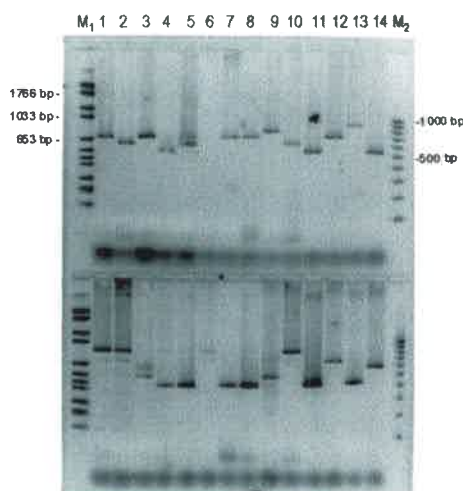


Figura 64: Productos de amplificación del gen *coa* en cepas de *S. aureus*. Primera línea: cepas aisladas de huéspedes humanos. Segunda línea: cepas aisladas de huéspedes bovinos. M₁: marcador de peso molecular 1000 bp. M₂: marcador de peso molecular 100 bp.

c) Gen *cflA*

La amplificación el gen *cflA* resultó en un único fragmento de 1000 pb, el cual se encontró en el 89% de las cepas de *S. aureus*. El 11% de las cepas, cuatro cepas aisladas de bovinos y 1 de alimentos, presentaron un fragmento de 900 pb (Figura 65).

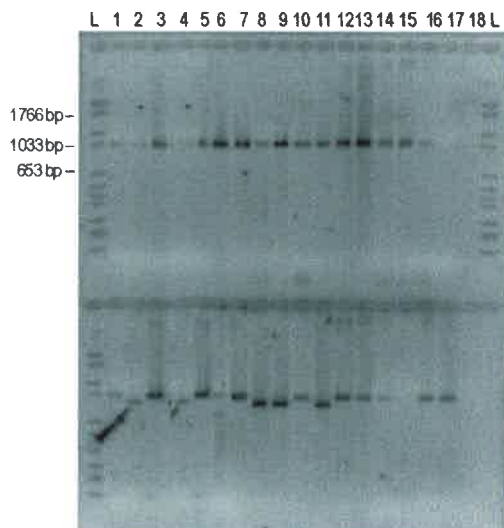


Figura 65: Productos de amplificación del gen *cflA* en cepas de *S. aureus*. Primera línea: cepas aisladas de huéspedes humanos. Segunda línea: cepas aisladas de huéspedes bovinos. M₁: marcador de peso molecular 1000 bp. M₂: marcador de peso molecular 100 bp.

Tabla 20: Características genóticas de cepas de *S. aureus* aisladas de distintos orígenes

CEPA	ORIGEN	LUGAR	BIOTIPO	PERFIL ANTIMICROBIANO	GENES ANALIZADOS						
					spa X Nº de repetidos	coa Nº de repetidos	clfA	cna	Polisacárido capsular nº	Clase agr	sae
516	Hueso	Río Cuarto	NE1	Pn, Amp	8	5	1000	-	No 5 no 8	3	-
522	Mat. respiratorio	Río Cuarto	Human	Pn, Er, Sm, Nov, Amp	2	5	1000	-	No 5 no 8	-	-
527	Hemocultivo	Buenos Aires	NE4	Pn, Er, Kan, Amp, Ox	9	5	1000	+	5	2	+
532	Hemocultivo	Buenos Aires	NE5	Pn, Er, Sm, Tc, Ce, Kan	5	4	1000	+	8	1	+
532-1	Cateter	Buenos Aires	Human	Pn, Er, Sm, Amp, Ox	9	1	1000	-	5	-	+
534	Herida quirúrgica	Buenos Aires	Human	Pn, Amp	9	5	1000	-	5	-	+
536	Infección en piel	Buenos Aires	Human	Pn, Sm, Tc, Nov, Amp	9	5	1000	+	No 5 no 8	3	-
537	Infección en piel	Río Cuarto	Human	Pn, Sm, Amp, Ox	10	5	1000	+	5	2	+
538	Cateter	Río Cuarto	NE4	Pn, Er, Tc, Kan	9	5	1000	-	5	2	-
541	Hemocultivo	Río Cuarto	Human	Pn, Er, Sm	9	5	1000	-	5	2	+
543	Cateter	Río Cuarto	Human	Amp	9	8	1000	-	5	-	+
544	Infección urinaria	Río Cuarto	NE4	Tc	9	6	1000	-	5	3	+
546	Cateter	Río Cuarto	Human	Pn, Er, Sm, Tc, Amp, Ox	5	4	1000	-	5	2	+
551	Cateter	Buenos Aires	Human	Pn, Tc, Amp	9	2	1000	-	8	3	+
557	Portador nasal	Río Cuarto	NE4	-	4	5	1000	+	8	3	+
220	Portador nasal	Río Cuarto	NE1	Pn, Sm, Kan, Ox	2	2	1000	-	No 5 no 8	2	-
228	Portador nasal	Río Cuarto	NE1	Pn, Sm, Tc, Er, Tc, Ox	4	7	1000	-	No 5 no 8	3	-
253	Portador nasal	Río Cuarto	Human	-	10	2	1000	-	8	3	-
203	Portador nasal	Río Cuarto	NE3	Pn	10	7	1000	-	5	1	-
239	Portador nasal	Río Cuarto	NE4	Pn	4	7	1000	-	5	1	+
240	Portador nasal	Río Cuarto	NE5	Pn	4	7	1000	-	No 5 no 8	3	-
243	Portador nasal	Río Cuarto	Human	Pn	8	2	1000	-	No 5 no 8	-	-
702	Vaca	Buenos Aires	NE1	-	10	2	1000	-	5	2	-
713	Vaca	Buenos Aires	Bovine	-	9	2	1000	-	5	-	+
719	Vaca	Buenos Aires	Bovine	-	10	8	1000	-	5	2	+
720	Vaca	Buenos Aires	Bovine	Pn	10	1	900	-	No 5 no 8	2	-
722	Vaca	Buenos Aires	Bovine	Pn, Sm	9	4	900	-	No 5 no 8	2	-
725	Vaca	Buenos Aires	Bovine	Sm	9	7	1000	-	5	3	+
726	Vaca	Buenos Aires	NE2	Pn-Sm	8	7	1000	-	5	-	+
728	Vaca	Buenos Aires	Bovine	-	8	7	1000	-	5	1	+
730	Vaca	Buenos Aires	NE5	-	9	1	900	-	No 5 no 8	1	-
732	Vaca	Buenos Aires	NE2	Pn	9	7	1000	-	5	1	+
734	Vaca	Buenos Aires	NE2	Sp	10	7	1000	-	5	2	+
743	Vaca	Buenos Aires	Bovine	Sm	9	2	900	-	No 5 no 8	1	-
745	Vaca	Buenos Aires	NE2	Pn	10	7	1000	-	5	3	+
747	Vaca	Buenos Aires	NE1	Sm	2	4	1000	-	5	2	+
836	Vaca	Río Cuarto	Bovine	-	2	7	1000	-	No 5 no 8	-	-
837	Vaca	Río Cuarto	Bovine	-	9	4	1000	-	No 5 no 8	2	-
AI14	Helado	Río Cuarto	NE2	-	11	4	1000	-	8	2	+
AI17	Helado	Río Cuarto	NE1	-	10	1	900	-	No 5 no 8	-	-
AI18	Helado	Río Cuarto	NE2	-	11	4	1000	-	8	2	-
AI20	Helado	Río Cuarto	NE2	-	6	5	1000	-	-	1	-
AI23	Helado	Río Cuarto	NE2	-	2	8	1000	-	No 5 no 8	-	-
AI24	Helado	Río Cuarto	NE2	-	11	4	1000	-	8	2	+
2N1	Torta	Río Cuarto	NE1	-	10	4	1000	-	No 5 no 8	-	-
SM1	Cake	Río Cuarto	NE4	-	10	5	1000	-	5	2	+

4) Gen *cap*

Las cepas fueron analizadas por PCR para la presencia del gen que codifica para el polisacárido capsular tipo 5 y tipo 8. Se encontró que el 46% del total de cepas portaba el gen para el polisacárido capsular tipo 5 y el 15% el gen para el polisacárido capsular tipo 8. El 37% de las cepas ensayadas fueron negativas para ambos genes. *cap 5* se encontró presente en el 48% y 60% de las cepas humanas y bovinas, respectivamente (Figura 66). Ninguna cepa bovina ensayada presentó *cap 8*. El 43% y el 14% de las cepas aisladas de alimentos presentaron *cap 5* y *cap 8*, respectivamente.

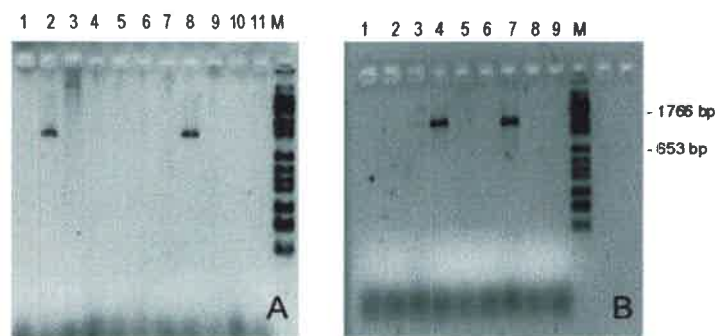


Figura 66: Productos de amplificación del gen *cap* en cepas de *S. aureus*. Foto A: Fragmentos correspondientes a la amplificación del tipo capsular 5. Foto B: Fragmentos correspondientes a la amplificación del tipo capsular 8. M: marcador de peso molecular 1000 bp.

d) Gen *cna*

Solo el 11% de las cepas analizadas fueron positivas para el gen *cna* y todas pertenecían a aislados humanos. El 75% de las mismas mostraron un fragmento de 1700 pb y el 25% un fragmento de 1200 pb, indicando 3 y 2 unidades repetidas, respectivamente (Figura 67). Las cepas que mostraron amplificación del gen corresponden a aislados de infecciones de piel, hemocultivo y portador nasal.

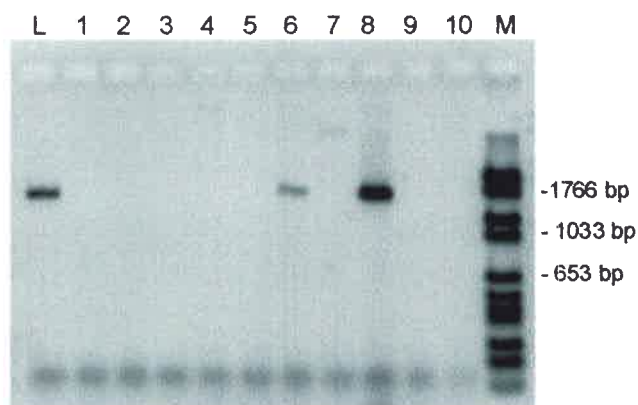


Figura 67: Productos de amplificación del gen *cna* en cepas de *S. aureus*. M: marcador de peso molecular 1000 bp.

e) Gen *sea*

La amplificación del gen *sea* mostró que el 85% de las cepas analizadas fueron positivas para dicho gen. Cuatro cepas aisladas de bovino, dos de alimentos y una de humano (27%, 14% y el 6.25% respectivamente), fueron negativas para la amplificación de dicho gen. En la Figura 68 se muestran los productos de amplificación.

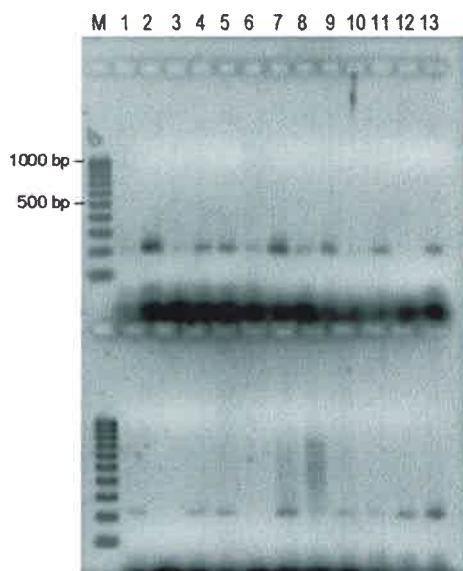


Figura 68: Productos de amplificación del gen *sea*. Línea 1: cepas de *S. aureus* aisladas de huéspedes humanos. Línea 2: cepas de *S. aureus* aisladas de huéspedes bovinos. M: marcador de peso molecular 100 bp.

1954

12

11

1954 (1954-1954)

11

1954-1954

f) Gen *agr*

Al clasificar las cepas de acuerdo a la clase de *agr*, se encontró que el 18% del total de las cepas ensayadas resultaron positivas para el gen *agr* clase I, el 38% para el *agr* clase II, el 22% para el *agr* clase III, resultando un 22% no clasificable con los cebadores analizados. Los resultados se muestran en la Tabla 21. El 35% de las cepas humanas fueron *agr* clase III, el 26% fueron *agr* clase II y el 17% fueron *agr* clase I. El 66% de las cepas aisladas de humanos de episodios clínicos resultó ser *agr* clase II y III. El 43% de las cepas aisladas de portadores resultó ser *agr* clase III. El 47% de las cepas bovinas se correspondieron con el tipo *agr* clase II, el 27% fue *agr* clase I y el 13% fue *agr* clase III. El 57% de los aislados de alimentos se clasificaron como *agr* clase II. Es importante resaltar que las cepas que portaban el gen *agr* clase I fueron las cepas menos patógenas y que el 57% de estas cepas se relacionan con el perfil *coa* 7. Las cepas *agr* clase I y clase II estuvieron asociadas a la presencia del tipo de polisacárido capsular 5 y las cepas *agr* clase II estuvieron asociadas a un ecotipo huésped específico. Se determinó además que el 50% de las cepas resistentes a metilicina pertenecían al grupo *agr* clase III. En la Figura 69 se muestran algunos de los productos amplificados.

Tabla 21: Clasificación de las cepas de *S. aureus* de acuerdo al gen *agr*.

ORIGEN	Clase <i>agr</i>								TOTAL
	agr I		agr II		agr III		no clasificado		
Episodios clínicos	2	12%	5	31%	5	35%	4		16
Portadores	2	28%	1	14%	3	43%	1		7
	4	17%	6	26%	8	35%	5		
Bovinas	4	27%	7	47%	2	13%	2		15
Alimentos	0	0%	4	57%	0	0%	3		7
TOTAL	8	18%	17	38%	10	22%	10	22%	45

Faint, illegible text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is centered and appears to be a list or a set of instructions, but the characters are too light to read accurately.

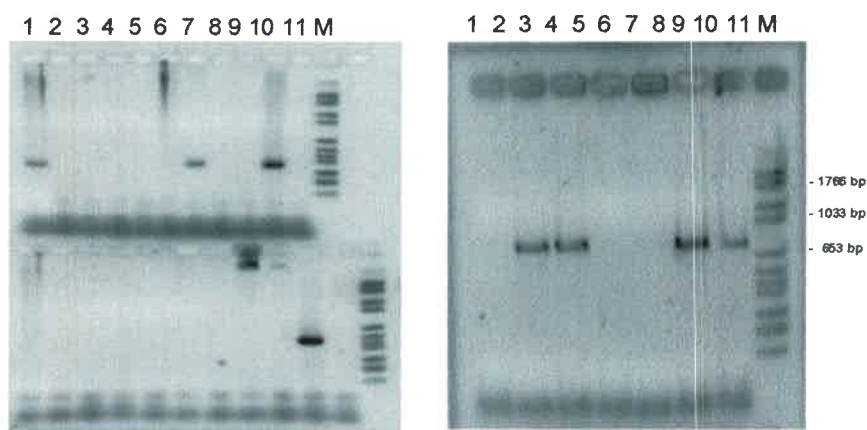


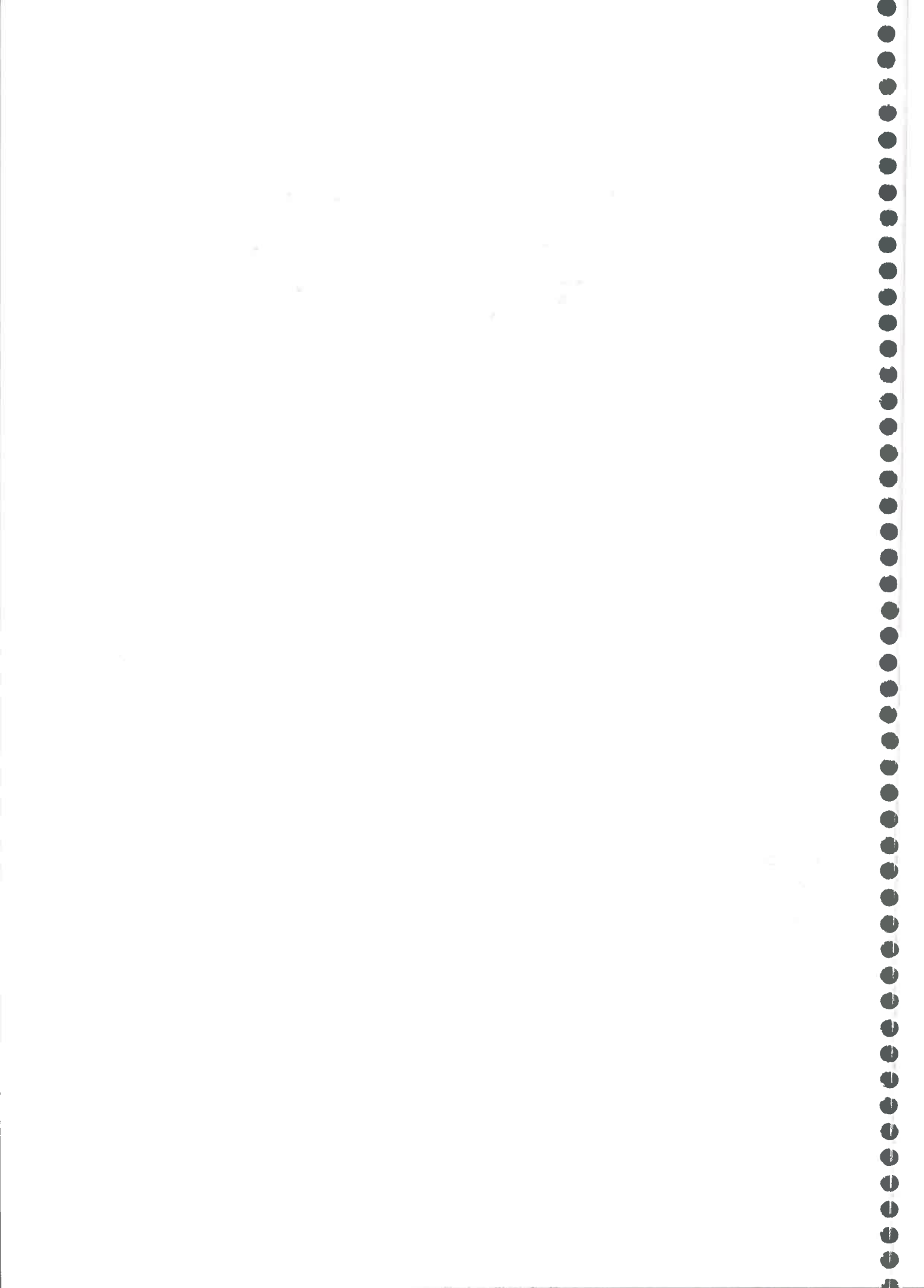
Figura 69: Productos de amplificación del gen *agr* cepas de *S. aureus*. A: Primera línea: *agr1*, segunda línea: *agr2*. B: *agr3*.

g) Gen *sae*

Detección del gen *sae*

Todas las cepas de *S. aureus* fueron analizadas para la presencia del gen *sae*. Se realizó la amplificación de la región *sae-cbs* con los pares de cebadores *S1-S4* y *S4-S7*. De acuerdo a los resultados obtenidos mediante esta técnica, solo un bajo porcentaje de cepas *S. aureus* portaban el gen *sae*. Con los cebadores *S7* y *S4* no pudieron obtenerse productos de amplificación en las cepas ensayadas. Por lo tanto se decidió continuar los ensayos con el par de cebadores *S1* y *S4*, los cuales abarcan todo el gen *sae* más una región de 200 pb que corresponde a una parte del gen *cbs*. Solo un 29% de las cepas ensayadas mostraron productos de amplificación. El 17% de los productos de amplificación correspondió a cepas aisladas de huéspedes humanos y el 42% a cepas aisladas de bovinos. Es importante destacar que los productos de amplificación obtenidos mostraron polimorfismos (Figura 70).

Para corroborar si la ausencia de productos de amplificación era debido a un problema de la técnica, se realizaron ensayos de PCR con diferentes concentraciones de ADN, pero no se obtuvieron productos de amplificación en ningún caso.



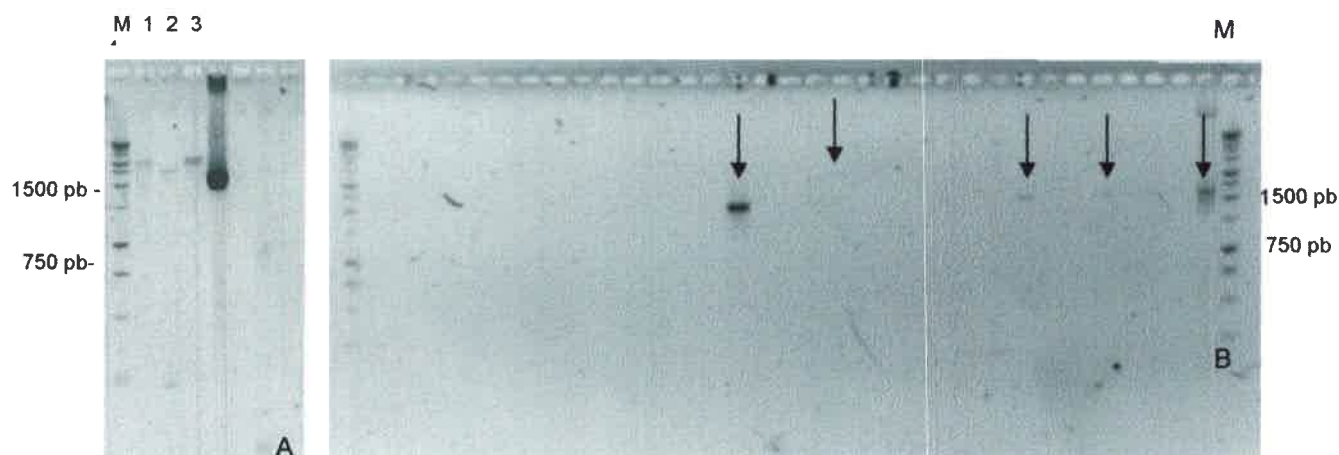


Figura 70: Productos de amplificación del gen *saeS-saeR* en cepas de *S. aureus* aisladas de huéspedes humano y bovino. Foto A: Calles 1-3 cepas de *S. aureus* aisladas de humanos. Calle 4 plásmido pRC9 portador del gen *sae*. Foto B: Productos de amplificación cepas de *S. aureus*. M: marcador de peso molecular de 1kb.

Por otro lado, se determinó la presencia del gen *saeR* con los cebadores S3 y S7. En la Figura 71 se muestran los productos obtenidos a partir de la amplificación. Se encontró que el 62% de las cepas ensayadas presentaron fragmentos de amplificación, el 50% correspondió a cepas aisladas de huéspedes humanos, el 79% a cepas aisladas de huéspedes bovinos y el 61% a cepas aisladas de alimentos.

Resulta importante destacar que el 50% de las cepas *agr I* y *agr II* y el 75% de las cepas *agr III* mostraron productos de amplificación para el gen *sae* (*R* y *RS*) y que el 90% (18 de 20) de las cepas con polisacárido capsular tipo 5 resultaron positivas para la amplificación del gen *sae* y compartían un mismo genotipo por RAPD-PCR.

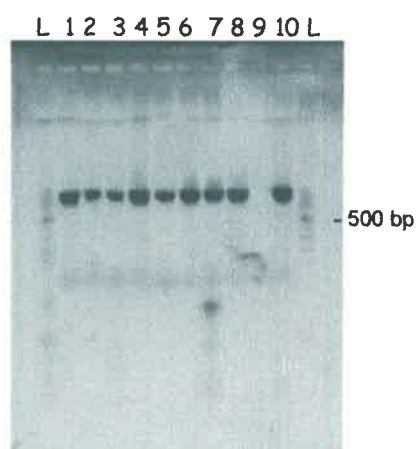


Figura 71: Productos de amplificación del gen *saeR* en cepas de *S. aureus* aisladas de huéspedes bovino. M: marcador de peso molecular.

Determinación del polimorfismo del gen *sae*

Los productos obtenidos a partir de la amplificación el gen *saeR* fueron digeridos con las enzimas *EcoRI* y *AccI*. Todos los digestos obtenidos mostraron iguales pesos moleculares (Figura 72).

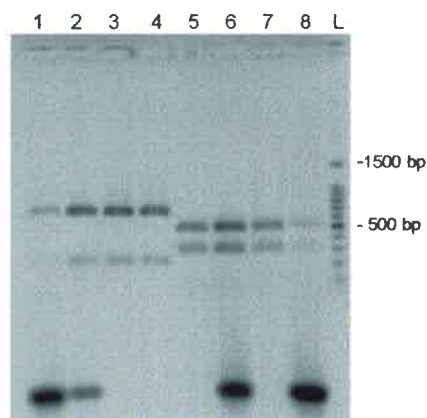


Figura 72: Perfiles de digestión de los productos del gen *saeR*. Calles 1-4 cepas de diferente origen digeridas con *AccI*. Calles 5-8 las mismas cepas digeridas con *EcoRV*. M= marcador de PM.

h- Determinación del gen *hld*

Los ensayos de amplificación del gen *hld* se muestran en la Figura 73. Se obtuvieron productos de amplificación en el 77% de las cepas ensayadas.

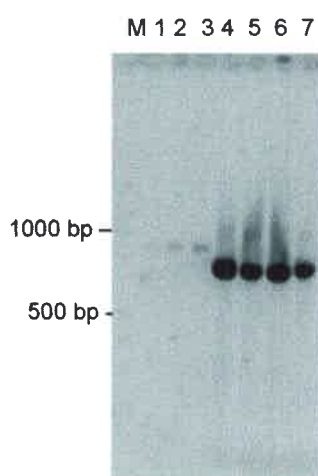


Figura 73: Productos de amplificación del gen *hld* en cepas aisladas de huéspedes humanos.

Los datos, tanto de *sae* como de *hld*, muestran que no en todas las cepas los genes pudieron ser amplificados.

9) DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE HEMOLISINAS

Se realizó la determinación de hemolisinas α y β en placas de agar sangre de carnero para relacionar la presencia o ausencia de las mismas con la presencia del gen *sae*. La producción de hemolisinas es un factor importante en la patogenicidad y el gen *sae* regula la producción de dichas hemolisinas.

De acuerdo a los datos obtenidos se encontraron asociaciones entre hemólisis y presencia o ausencia del gen *saeR* por PCR. La producción de hemolisinas fue menor cuando el gen no pudo ser amplificado por PCR y a la inversa. En la Figura 74 se muestran las hemolisinas características de un grupo de cepas. Como control se empleó la cepa de *S. aureus* 479.

En la Tabla 19 se muestran las cepas y la presencia cualitativa de hemolisinas, en general las cepas que fueron negativas para la amplificación no presentaron ninguna de las hemolisinas determinadas o bien presentaron disminución de alguna de ellas, excepto para las cepas 5321 y 5271.

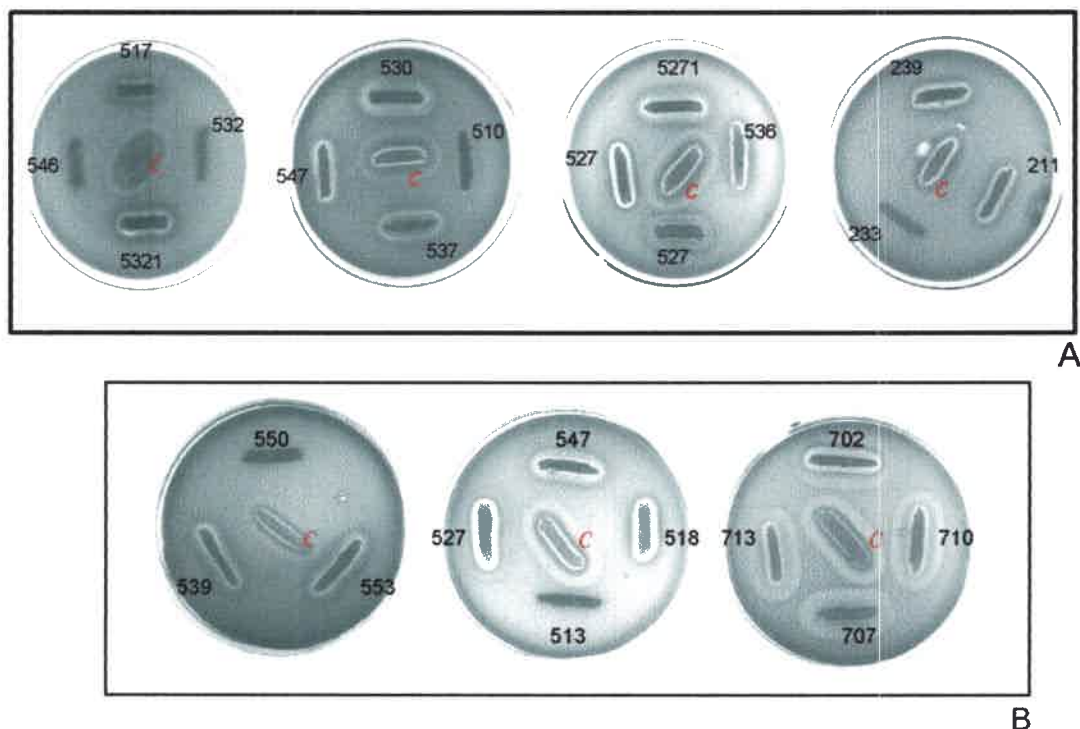


Figura 74: (a) Hemólisis producida por cepas de *S. aureus*. C: cepa control *S. aureus* 479. (b) Hemólisis se cepas cuyo producto del gen *sae* pudo ser amplificado.

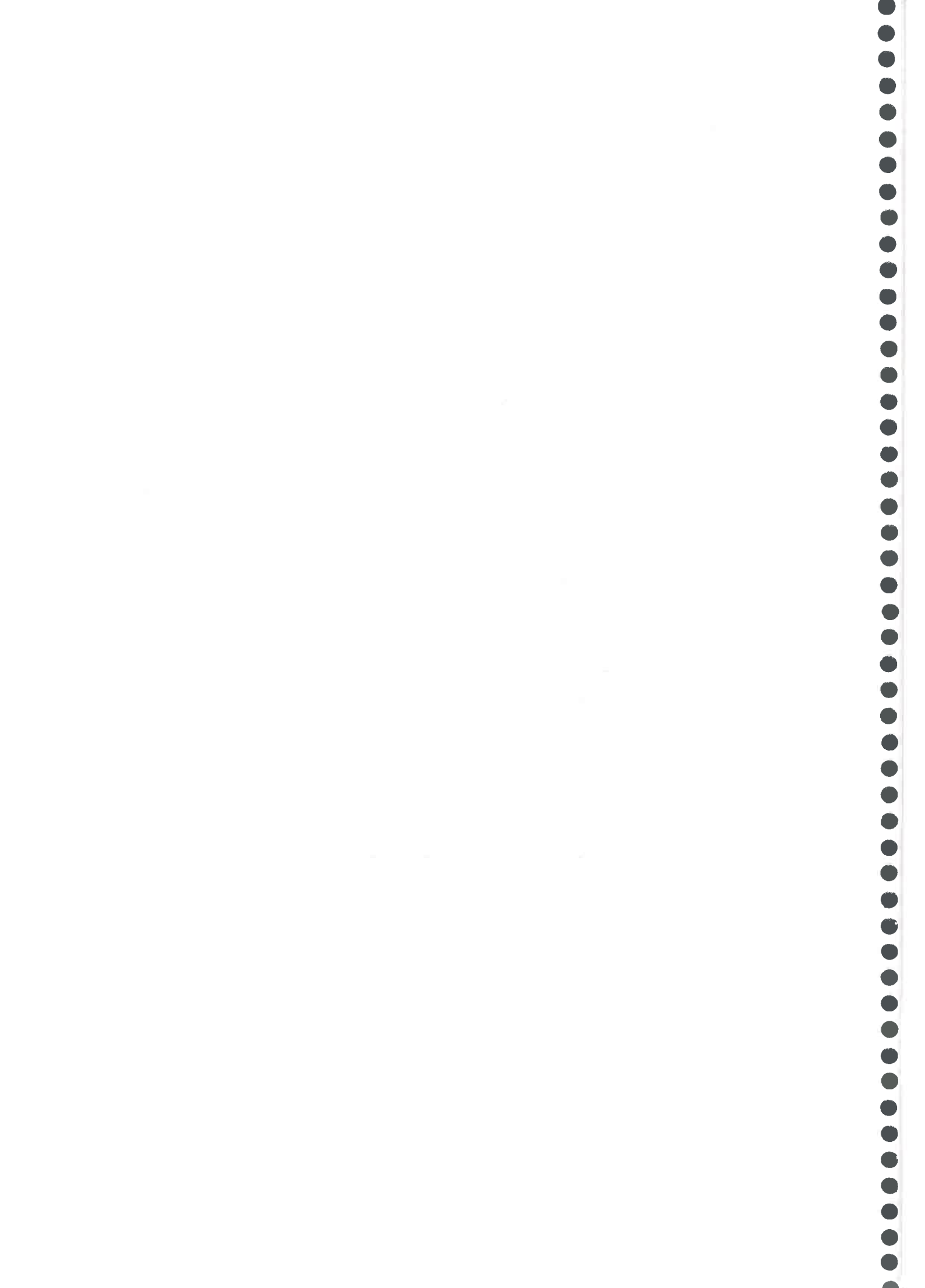


Tabla 22: Relación presencia de gen *sae* y hemolisinas α y β .

CEPA N°	α hemólisis	β hemólisis	<i>sae</i>
517	+	+	-
546	+*	-	-
5321	++	++	-
532	-	+	-
530	+	++	-
547	++	+	+
537	+	+	-
510	-	-	-
5271	++	++	-
527	++	++	+
528	+	+	ND
536	+++	++	-
239	++	++	+
233	+*	-	ND
211	++	+	ND

ND: no determinado, * hemólisis débil.

10) DETERMINACIÓN CUALITATIVA DE COAGULASA

Siguiendo el mismo objetivo anterior se determinó cualitativamente la producción de coagulasa.

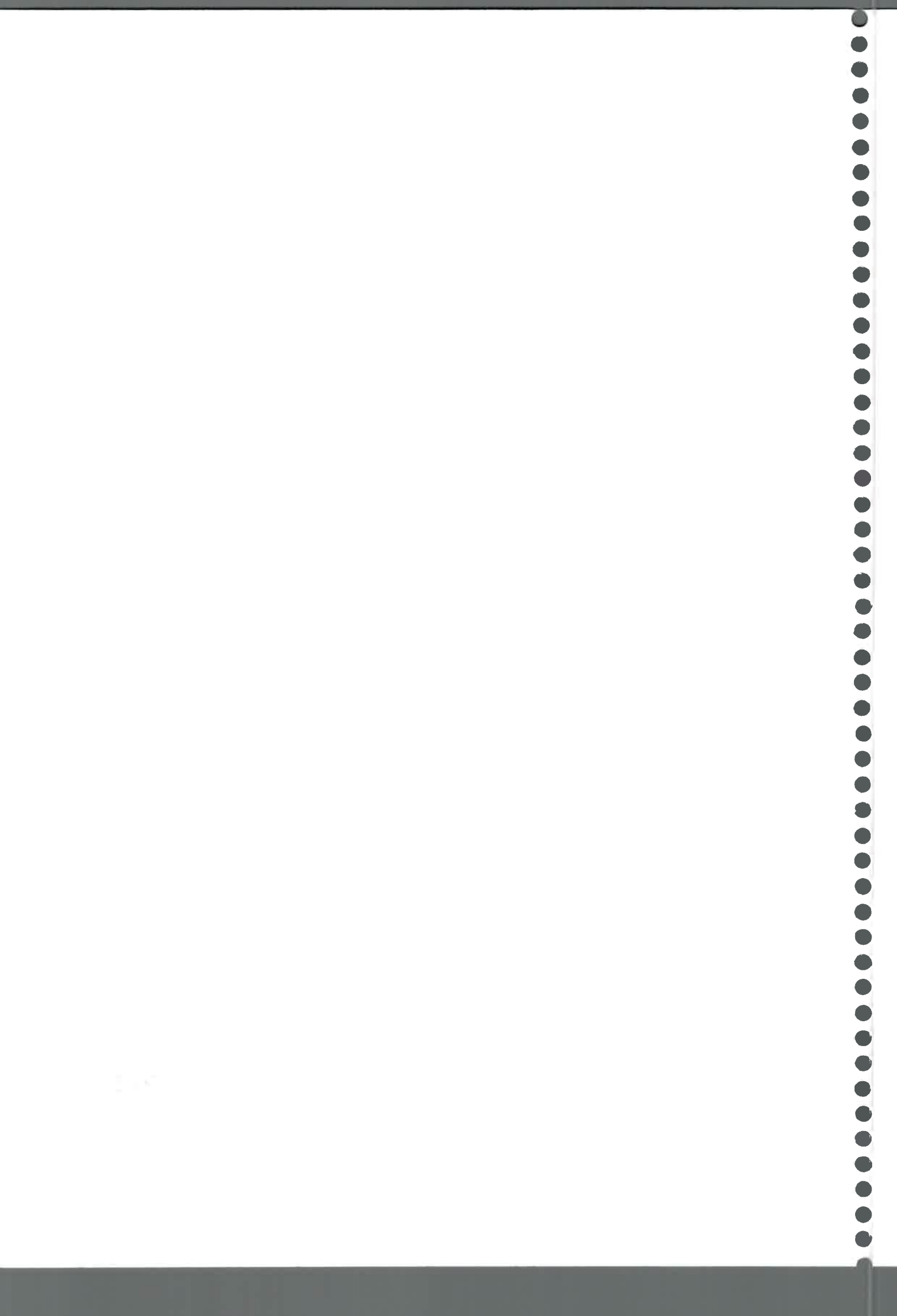
En la siguiente tabla se muestran las asociaciones entre coagulasa y presencia- ausencia de productos de amplificación del gen *sae* obtenidas de tres cepas de *S. aureus*.

Tabla 23: Relación coagulasa y presencia del gen *sae*.

CEPA	COAGULASA			
	TITULO		<i>sae</i>	<i>saeR</i>
H10	1/100	-	-	-
B13	1/1000	+	-	+
B33	1/1000	+	-	+



Discusión



1- AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE *S. aureus*

Se aislaron y caracterizaron cepas de huéspedes humano, bovino y de alimentos. Resulta interesante destacar que se trabajó con cepas aisladas de alimentos y de materiales contaminados debido a la importancia que tienen estas cepas en Salud Pública. Aunque las manos de los manipuladores son frecuentemente la mayor fuente de contaminación en los brotes, el equipo y las superficies ambientales también pueden ser fuentes de contaminación con *S. aureus*.

De acuerdo a las características bioquímicas y hemolíticas, todos los aislados pudieron ser identificados como *S. aureus*. Las colonias de las cepas aisladas de huéspedes humanos produjeron pigmentos amarillos o naranja, lo cual coincide con estudios previos, Willis y col. (1966) demostraron que más del 90% de las cepas aisladas de fuentes clínicas son pigmentadas. En cambio las cepas aisladas de huéspedes bovinos y de portadores humanos fueron en su mayoría no pigmentadas. Las cepas de *S. aureus* no pigmentadas se encuentran frecuentemente en subcultivos de microorganismos conservados en agar, aunque pueden originarse también de colonias no pigmentadas, mostrando apariencia sectorial. También se conoce que el tratamiento con nitrosoguanidina puede resultar en una pérdida irreversible de la capacidad de sintetizar pigmento (Grinsted y Lacey, 1973). Esta última observación sugiere que mutaciones puntuales influenciarían en el cambio de pigmentación. Los distintos trabajos sobre pigmentación en *S. aureus* sugieren que los genes responsables estarían localizados en plásmidos, debido a que la pérdida irreversible de caracteres en una alta frecuencia usualmente indica que los genes relevantes son parte de un plásmido, y que las cepas pigmentadas tendrían la ventaja *in vivo* de poseer resistencia a diversos factores ambientales como la desecación (Willis y col., 1966). De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, la pigmentación también podría estar relacionada con la virulencia de las cepas.

2-CARACTERIZACION DE CEPAS DE *S. aureus*: TECNICAS CONVENCIONALES

Todos los aislados fueron tipificables según el sistema de tipificación propuesto por Devriese (1985). Se observó que en el 42% de las cepas, los ecotipos se corresponden con el origen de las mismas. Resultados similares fueron observados por Devriese en cepas aisladas de distintos huéspedes (Devriese, 1985). El ecotipo humano fue el prevalente en cepas aisladas de huéspedes humanos de casos clínicos, siguiéndole el biotipo NE4, esto podría

deberse a que estos biotipos difieren solamente en la prueba de crecimiento en Agar Cristal Violeta o bien estaría indicando que se tratan de cepas patógenas. Capita y col. (2002) observaron que las cepas de biotipos no específicos, junto con las cepas de ecotipo humano son frecuentemente toxigénicas y podrían ser consideradas como las más peligrosas en Salud Pública.

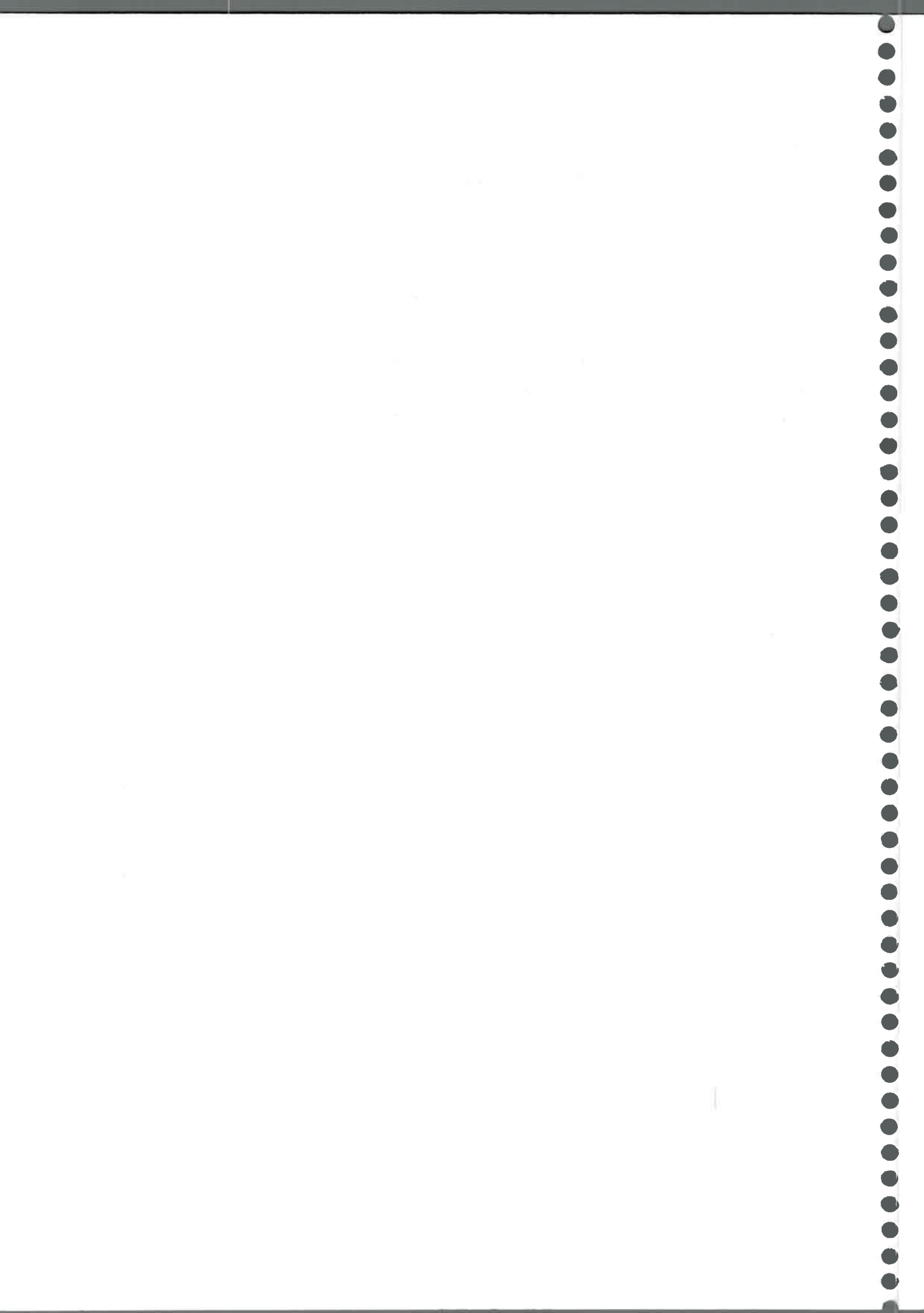
Un 38% de los aislados de portadores correspondieron al biotipo NE1, por otro lado entre las cepas bovinas se encontró que el 18% de las cepas pertenecían al biotipo NE1. Este resultado podría estar indicando una posible diseminación de cepas de portadores hacia bovinos. Diferentes trabajos utilizando técnicas a nivel genotípico demuestran la diseminación de cepas humanas a bovinos (Musser y Kapur, 1992; Zadoks y col., 2000;).

Es importante destacar que no se encontró asociación entre biotipos y sitios de aislamiento (considerando como sitios de aislamiento en humanos piel, catéter, hemocultivo, etc. y considerando tambos en bovinos).

Entre los aislados de alimentos se encontró que un bajo porcentaje correspondió al ecotipo humano, estos resultados concuerdan con otros trabajos (Capita y col., 2002) y estarían indicando que, en general, no hubo contaminación por parte de huéspedes humanos o bien la misma fue baja luego del procesamiento del alimento. El 71% de las cepas aisladas de alimentos correspondió al biotipo NE2, estos resultados no coinciden con los hallados por Devriese (1985), quien observó que la mayoría de las cepas analizadas correspondían a los ecotipos humano y aviar, aunque resulta importante destacar que en los estudios realizados no se informa el tipo de alimento analizado. El biotipo NE2 se encontró relacionado en un 15% con cepas aisladas de leche. Este dato podría estar indicando que los alimentos podrían estar contaminados con cepas bovinas.

Los resultados obtenidos muestran que en general la técnica de biotipificación puede diferenciar a los aislados de acuerdo al origen (humano, bovino o alimentos). Aunque el hecho de haber encontrado diferencias entre los huéspedes humano y bovino, podría deberse a que entre las técnicas usadas en el sistema de biotipificación se determinó β hemolisina y dicha hemolisina es producida entre el 75% y 100% por los aislados bovinos y entre el 10% y 15% en los aislados humanos.

El sistema de biotipificación en *S. aureus* ha sido usado para determinar el origen de este microorganismo en varios productos alimenticios (De Buyser y col., 1987; Devriese, 1985; Rosec y col., 1997). Sin embargo varias dificultades han sido encontradas al realizar el método. Entre ellas se pueden mencionar los errores en los resultados, debido a las condiciones de la técnica, la estandarización de los reactivos, los problemas de interpretación en la determinación



de la β -hemolisina, en la coagulación del plasma bovino y en la prueba de cristal violeta. Estas dificultades son debidas a la falta de Kits comerciales disponibles. Aunque en la bibliografía también se menciona que esta técnica es poco confiable y es necesario realizar otras técnicas de tipificación para discriminar cepas (Hennekinne y col., 2003). En este trabajo los resultados obtenidos muestran que en general, la técnica puede diferenciar los aislados de acuerdo al huésped (huésped humano o bovino).

Aproximadamente el 45% del total de aislados en el presente estudio fueron penicilina resistente, lo cual es consistente con la observación de otros autores (De Oliveira, 2000; Lowy, 2003). Los niveles de resistencia para las cepas aisladas de huéspedes humanos (tanto de episodios clínicos como de portadores) fueron altos.

Resulta interesante el hecho que un elevado porcentaje de las cepas (31%) aisladas de huéspedes humanos mostró resistencia a 4 o más de los antibióticos ensayados esto podría estar relacionado con lo informado en la bibliografía que sugiere que la administración indiscriminada de antibióticos, sin previa determinación de la susceptibilidad de las cepas conduciría a fenómenos de transferencia genética con la consecuencia del surgimiento de mecanismos de resistencia a todos los antibióticos ensayados. En contraste con otros autores como Martínez y Baquero (2002) quien sugiere que ciertos sistemas de resistencia a antibióticos, como los sistemas de bombeo múltiple de droga, las β -lactamasas cromosómicas, algunas enzimas inactivantes de antibióticos y ciertas cloranfenicol-acetil-transferansas, no son mecanismos de resistencia adquiridos y posteriormente seleccionados como consecuencia del tratamiento antibiótico, sino que se encuentran en las estirpes de todas las bacterias analizadas. El desarrollo de agentes antimicrobianos con nuevos mecanismos de acción actualmente es limitado debido a fallas atribuidas a estrategias, que no consideran los mecanismos de resistencia intrínsecos de la bacteria, como por ejemplo los biofilms y los sistemas de bombeo múltiple, los cuales contribuyen a la resistencia bacteriana in vivo (Lowy, 2003).

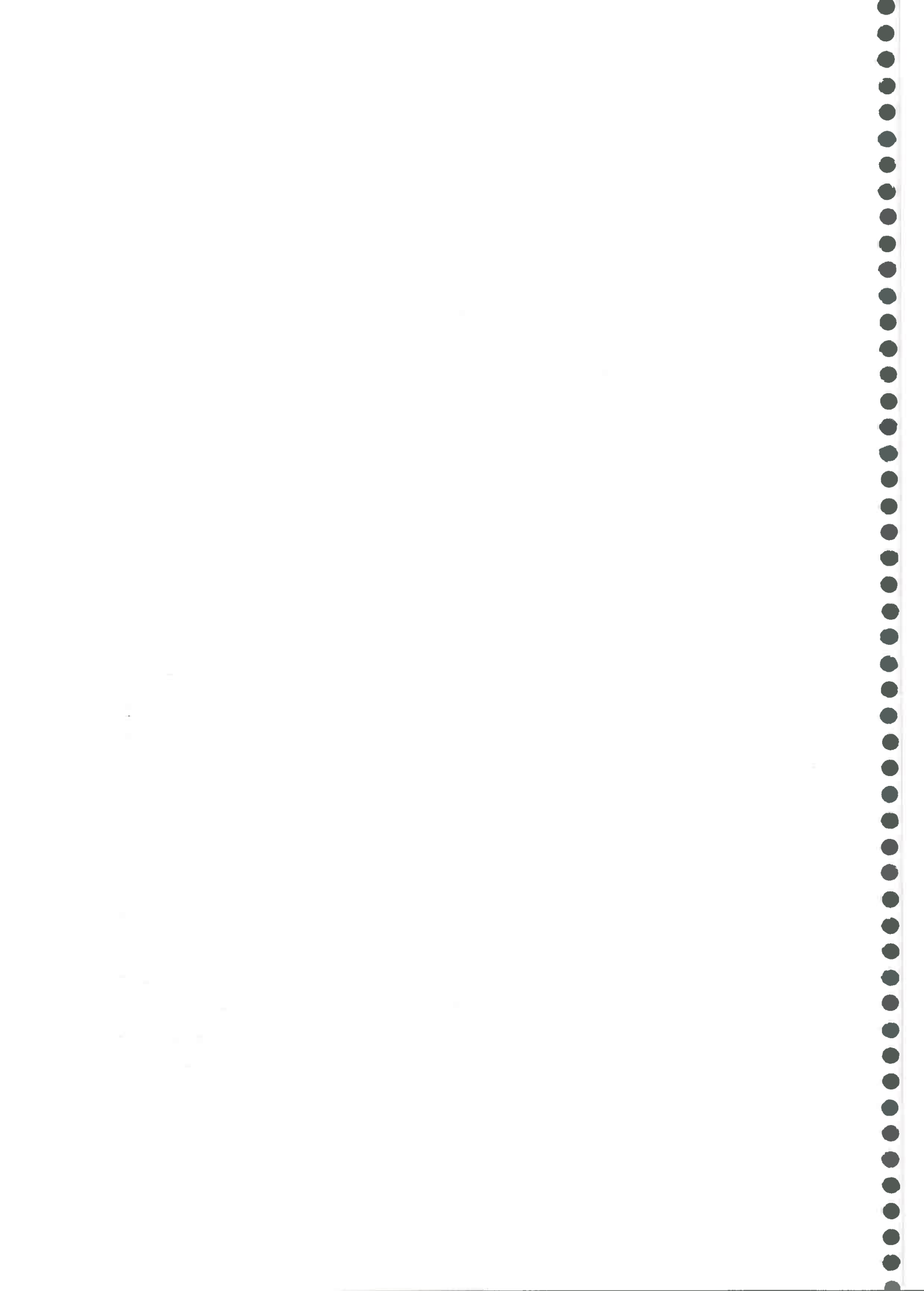
Los porcentajes de resistencia a penicilina en cepas aisladas de episodios clínicos encontrados en el presente trabajo (71%) coinciden con otros autores, quienes informan que aproximadamente el 90% de cepas aisladas de infecciones son resistentes a penicilina (Del Vecchio y col., 1995; Chambers, 2001; Ito y col., 2001; Lowy, 2003).

Se determinó la resistencia a meticilina, ya que un alto porcentaje (90%) de las cepas aisladas de episodios clínicos, tanto de humanos como bovinos, mostraron tener perfiles semejantes al ser ensayadas por RAPD-PCR. De acuerdo a la bibliografía, una gran cantidad

de cepas resistente a metilicina poseen perfiles genéticos semejantes y se sugiere que compartirían un mismo origen clonal (Kreiswirth y col., 1993; Kapur y col., 1995). Informes recientes de cepas MRSA aisladas en la comunidad conducen a suponer que la epidemiología de *S. aureus* está cambiando (Chambers, 2001). Tradicionalmente las infecciones por MRSA se adquirían en hospitales, actualmente pueden ser adquiridas en la comunidad. En la bibliografía se menciona que el nicho ecológico de *S. aureus* son las narices anteriores de humanos sanos, aunque puede ser encontrado en diferentes sitios de la piel y superficies mucosas. La prevalencia e incidencia de los portadores nasales varía de acuerdo a la población en estudio. Informes recientes muestran un bajo porcentaje de portadores de *S. aureus* en la comunidad, actualmente el porcentaje ha aumentado considerablemente (CDC, 1999; Kluytmans y col., 1997). Resulta importante destacar que un 19% de las cepas aisladas de huéspedes humanos fueron MRSA y que de ellas el 6% correspondió a aislados proveniente de portadores. Ciertos estudios indican que la flora bacteriana nasal es modificada frente a la administración de antibióticos sistémicos y que la contaminación ambiental elevada con penicilina. Dentro de un hospital, constituye un factor de riesgo importante en la colonización de cepas de *S. aureus* penicilina resistente en las narices de los pacientes hospitalizados la cual conduce a la transmisión hacia otros pacientes.

También resulta interesante el hecho que 11 cepas (24%) aisladas de infecciones en piel y mucosas hayan mostrado altos niveles de resistencia a todos los antibióticos ensayados. Este dato podría estar sugiriendo que las cepas aisladas de estos sitios serían las que tienen mayor contacto con otras especies bacterianas, tanto en la comunidad como principalmente en el ambiente hospitalario, y esto podría favorecer el intercambio de ADN para su supervivencia y por consiguiente a la adquisición de genes de resistencia a antibióticos (Lowy, 2003).

La resistencia a antibióticos encontrada en cepas aisladas de huéspedes bovinos (50%) fue menor que aquella encontrada en las cepas aisladas de huéspedes humanos (87%), esto podría deberse a la menor presión de selección a la que están sometidas en su ambiente natural, ya que las infecciones intramamarias son tratadas con antibióticos diferentes de los que se usan en las infecciones en humanos y además las concentraciones empleadas en bovinos son menores. Estudios en *Escherichia coli* han demostrado que los aislados obtenidos de huéspedes humanos, pollos y bovinos tienen mayores índices de resistencia a antibióticos que los animales salvajes y esto se debe a la diferente presión de selección a las que están sometidas las cepas (Krumperman, 1983).



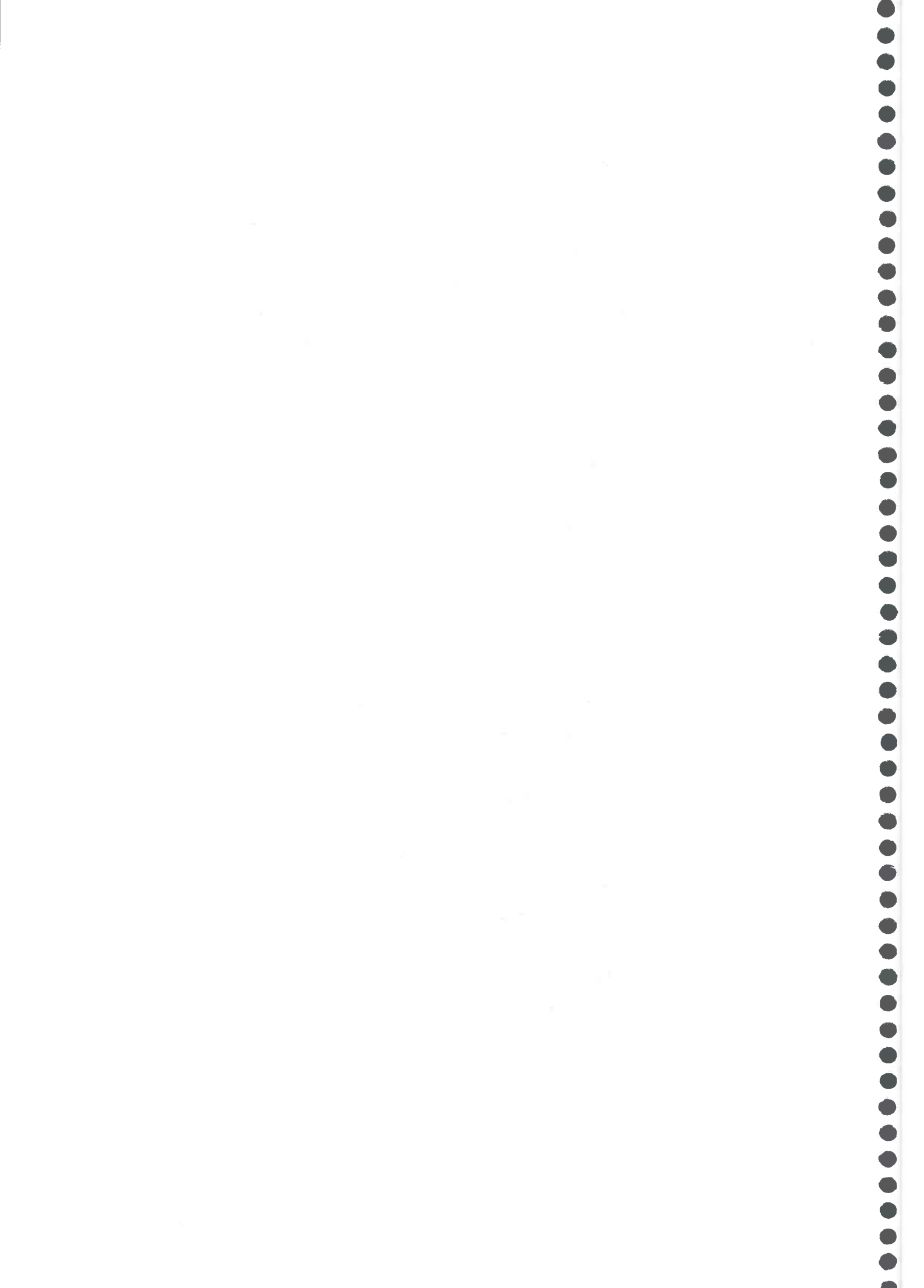
Por otro lado, al analizar las cepas según las regiones, resulta de importancia considerar los diferentes perfiles de antimicrobianos encontrados. Estos resultados podrían estar indicando diferencias en el manejo y práctica de antimicrobianos en los tambos, particularmente en el tipo y frecuencia del antimicrobiano usado. Los perfiles antimicrobianos fueron de limitado valor en diferenciar cepas relacionadas, este hecho podría deberse a que el 48% de las cepas bovinas fueron susceptibles a los antimicrobianos ensayados.

Los antibióticos beta-lactámicos se utilizan frecuentemente para el tratamiento de mastitis bovina en nuestro país. Dentro de este grupo de antimicrobianos, la penicilina es el representante más antiguo. Las drogas utilizadas en el tratamiento de mastitis durante los últimos años en la región lechera de Córdoba son las que han inducido más resistencia (Pn, Tc, Sm y Sp). En este estudio se encontró que un 30% de las cepas fueron resistentes a penicilina, lo cual fue semejante a lo hallado en estudios realizados en cepas provenientes de otras cuencas lecheras (Gentilini y col., 2000), aunque porcentajes relativamente menores fueron encontrados en diferentes países de Europa (De Oliveira y col., 2000). En un trabajo reciente Vintov y col. (2003) al realizar un análisis en 815 cepas de *S. aureus* aisladas de 10 países europeos encontró un porcentaje de ocurrencia de 32.4% de resistencia a penicilina.

El 100% de las cepas aisladas de huéspedes bovinos resultaron ser susceptibles a cefalotina. Estos datos coinciden con lo encontrado por otros autores (Calvinho y col., 2002), si bien existen escasos datos en nuestro país acerca de la susceptibilidad *in vitro* de cepas de *S. aureus* frente a varias cefalosporinas. Estudios realizados en 40 cepas provenientes de siete establecimientos de la cuenca lechera central, mostraron una sensibilidad del 100% a este antimicrobiano (Heer y col., 1990). Estudios recientes muestran escasa o nula resistencia a cefalosporinas de primera generación, como por ejemplo cefalotina (Acuña y col., 2000; Gentilini y col., 2000).

En este trabajo no se encontraron cepas bovinas resistentes a oxacilina. Estos datos estarían indicando que las cepas meticilino resistentes no representan un problema importante en los rodeos lecheros en Argentina, a pesar del uso frecuente de diferentes β -lactámicos. En los aislados bovinos, es raro encontrar resistencia a meticilina, aunque ha sido informada en *Staphylococcus coagulasa* negativos en nuestro país (Gentilini y col., 2002), en Estados Unidos (Mc Donald y col., 1981), Europa (Aestrup y col., 1995) y Japón (citado en Zadoks y col., 2000).

La información acerca de la susceptibilidad de los patógenos de mastitis frente a los agentes antimicrobianos puede ser utilizada, en conjunto con otros parámetros, como guía para la selección de drogas para la terapia de mastitis. Contar con esta información y su



variación en el tiempo es de primordial importancia al aplicar un plan de control. Asimismo, en medicina veterinaria es importante desarrollar criterios de interpretación de susceptibilidad, ya que los actuales criterios provienen de antibióticos referidos a seres humanos.

No se encontró relación entre los ecotipos prevalentes, bovino y humano, con el perfil de resistencia a antibióticos. Esto puede deberse a que el 50% del total de cepas fueron susceptibles a los antibióticos ensayados. Es importante destacar que se observaron diferentes perfiles de resistencia a antibióticos en las poblaciones humanas y bovinas de las cepas ensayadas, demostrando que el perfil de antibióticos también podría ser usado para diferenciar cepas aisladas de huéspedes humanos y bovinos.

3-CARACTERIZACION DE CEPAS DE *S. aureus*: TECNICAS MOLECULARES

El rol de los plásmidos en cepas de *S. aureus* aisladas de huéspedes humanos y bovinos está bien documentado (Piccini y Zecconi, 2001). Estudios previos realizados en cepas aisladas de huéspedes humanos, muestran que los plásmidos de *S. aureus* se encuentran en cepas epidemiológicamente relacionadas. Sin embargo el uso de los perfiles plasmídicos como marcadores de virulencia en cepas aisladas de mastitis no ha sido considerado de importancia. Una de las razones se debe a que estudios previos mostraron que entre el 25 y el 75% de los aislados de mastitis bovina no portaban plásmidos (Matthews y col., 1992; Aarestrup y col., 1999). Por otro lado, Piccini y Zecconi (2001) demuestran que la mayoría de las cepas de *S. aureus* (96%) analizadas pudieron ser caracterizadas por la presencia de uno o más plásmidos.

En el presente trabajo se realizó la extracción de ADN plasmídico en cepas de *S. aureus* con el fin de encontrar alguna relación entre la presencia de plásmidos, origen de las cepas y perfiles de resistencia a antimicrobianos. Un 60% de las cepas aisladas de bovino presentaron plásmidos, aún cuando mostraron bajas o nulas resistencias a antimicrobianos. Este resultado estaría indicando que no hay relación entre resistencia y presencia de plásmidos. Resulta importante destacar los resultados contradictorios mencionados en la bibliografía informaron que el 96% de las cepas ensayadas portaban plásmidos (Piccini y Zecconi, 2001). Por otro lado Baumgartner y col. (1984) informó que cepas de *S. aureus* de diferente origen, resistentes a penicilina y estreptomicina mostraron similares perfiles plasmídicos, pudiendo asociarse con la resistencia a antibióticos. Sin embargo, Ombui y col. (2000) determinó que la mayoría de los aislados de *S. aureus* de leche fueron resistentes a varios antibióticos, pero no encontró relación entre plásmidos y perfiles de resistencia. Las

discrepancias encontradas entre los resultados del presente trabajo y la bibliografía podrían ser atribuidas a las diferentes técnicas usadas.

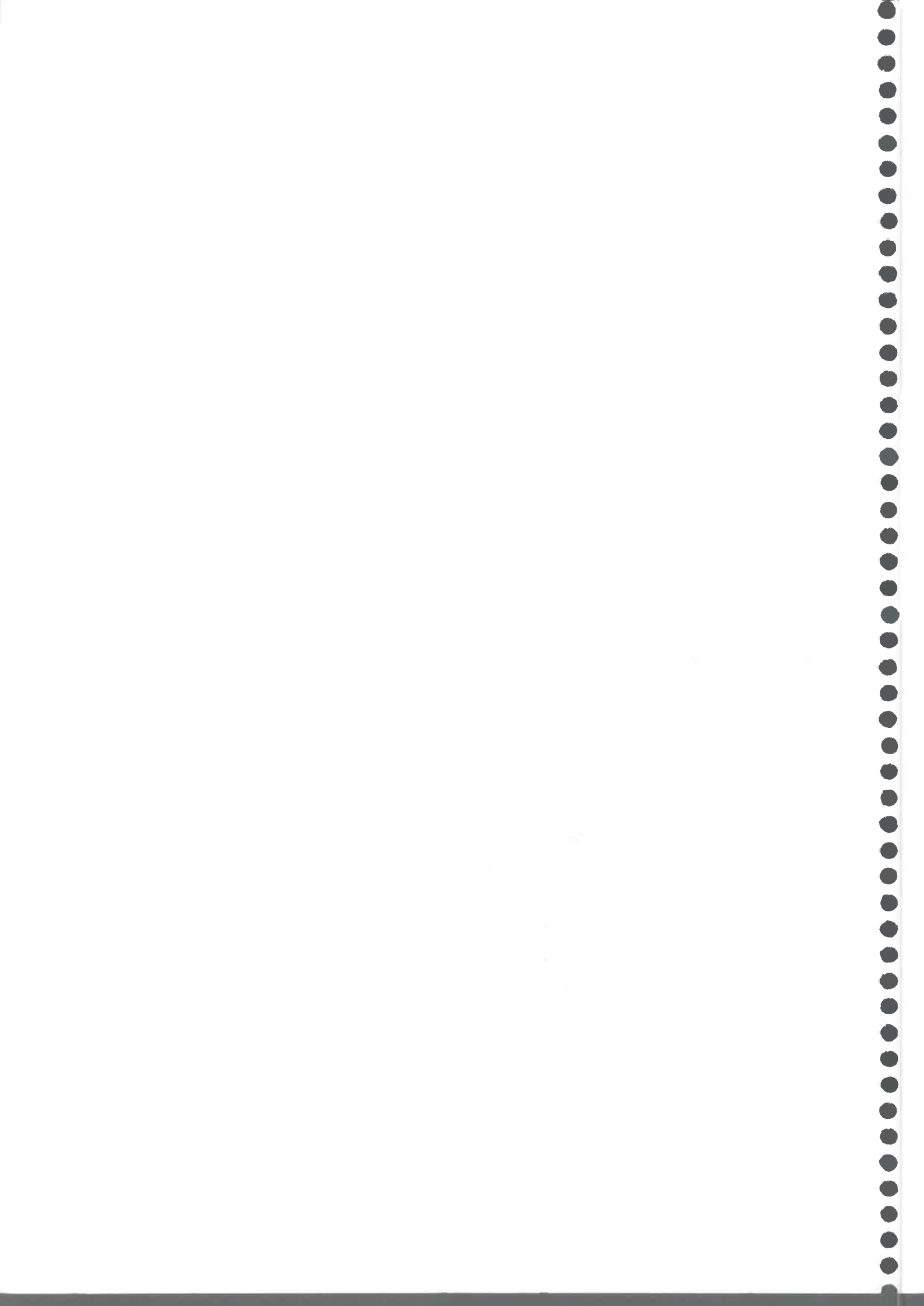
4- ANALISIS DE CEPAS DE *S. aureus* POR RAPD-PCR

Todos los aislados pudieron ser tipificados mediante las técnicas de RAPD-PCR y REP-PCR. Es importante destacar que la selección de cebadores es crítica para determinar el poder discriminatorio de RAPD-PCR y analizar los resultados. La tipificación mediante RAPD-PCR generada por la combinación de los tres cebadores *OLP6*, *OLP11*, *OLP13* aumentó la capacidad de la técnica para detectar variabilidad entre aislados. Este resultado está de acuerdo con lo informado por otros autores (Saulnier y col., 1993; Martínez y col., 2000).

De los cebadores utilizados para el análisis de las cepas humanas por RAPD-PCR, el *OLP6* fue el más discriminatorio, ya que pudo discriminar un mayor número de cepas, en cambio los cebadores *OLP11* y *OLP13* agruparon un mayor número de cepas.

La asociación entre biotipos y genotipos obtenidos por RAPD-PCR fue observada sólo para el cebador *OLP11*, esta asociación como no es estadísticamente significativa debería confirmarse analizando un mayor número de cepas. Sin embargo en todos los análisis las cepas pertenecientes al ecotipo humano se encontraron a una similitud genética relativa similar a las cepas pertenecientes al biotipo NE4. Esta similitud podría deberse a que ambos genotipos difieren en solamente una prueba que es el crecimiento en Cristal Violeta. Hennekinne y col. (2003) en un trabajo reciente al analizar 73 cepas de *S. aureus* de diferentes fuentes por electroforesis de campos pulsantes demuestra que las cepas que poseían el mismo biotipo fueron agrupadas específicamente en uno, dos o tres subgrupos diferentes, mostrando una posible asociación entre PFGE y biotipificación. En este trabajo no pudo encontrarse una asociación tan fuerte.

Resulta importante destacar las diferencias estadísticamente significativas según el test X^2 para los perfiles penicilina-eritromicina, penicilina-ampicilina y meticilina y genotipo. Esto estaría indicando una asociación entre determinados genotipos y la resistencia específica a antibióticos. Estos resultados fueron confirmados mediante el análisis de coordenadas principales. La relación entre resistencia a meticilina y perfiles genotípicos semejantes se informa en la bibliografía desde hace varios años.



Se observó una asociación entre genotipos y sitios de infección al realizar el análisis de coordenadas principales. La relación entre genotipos y sitios de infección (glándula mamaria, pulmones, riñones, piel) es un tema relativamente nuevo. *S. aureus* es una bacteria versátil con capacidad de colonizar y producir infecciones en diferentes partes del cuerpo humano. Poco se conoce acerca del tropismo de *S. aureus* para causar infección en sitios específicos. Sin embargo, existe evidencia que sugiere que ciertos genotipos tienen una mayor asociación con tejidos específicos. Booth y col. (2001) en un estudio epidemiológico molecular mediante el análisis de 405 cepas de *S. aureus* por electroforesis de campos pulsantes, identificó 5 grupos los cuales podrían estar asociados a infecciones sitio específica. Resulta de importancia conocer los genotipos asociados a un sitio específico de infección, ya que los factores que confieren ese tropismo (determinados factores de virulencia) podrían ser de utilidad en los avances de la terapia antiestafilocócica.

El análisis de coordenadas principales, con los tres cebadores mostró asociación de los perfiles genéticos entre el lugar de aislamiento, el sitio de infección y la resistencia a metilicina. La relación entre perfiles y lugar de aislamiento es clara, una misma cepa pudo haberse diseminado en un mismo lugar geográfico.

El análisis de las cepas bovinas con cada uno de los cebadores y con la combinación de ellos mostró una mayor diversidad genética que las cepas humanas.

Sobre la base de datos publicados, los perfiles genéticos dentro de cada especie bacteriana comparten fragmentos comunes o conservados, los cuales definen a los aislados como miembros de la misma especie. Los fragmentos variables o polimorfismos indican la diversidad de las poblaciones bacterianas. En este trabajo se observó una variación genética entre tambos y dentro de cada tamba. Los tambos analizados tenían más de 3 genotipos. Aunque ciertos genotipos se encontraron en diferentes tambos, sugiriendo una diseminación, esto podría deberse a la proximidad de los establecimientos. Por otro lado, al igual que para los aislados humanos, se observó que las cepas que se agrupaban juntas con un cebador a veces diferían dependiendo del cebador usado.

También resulta importante destacar que al realizar el análisis al 80% de similitud se encontraron pocos genotipos, por ejemplo en el dendrograma de las cepas aisladas de Buenos Aires puede observarse que las cepas tendrían un mismo origen clonal. Este resultado coincide con los obtenidos por Matthews y col. (1994), Fitzgerald y col. (1997), Myllys y col. (1997) y Annemüller y col. (1999), los cuales confirman la hipótesis de la existencia de un limitado número de clones especializados en producir mastitis bovina.

Pocos estudios en cepas de *S. aureus* aisladas de huéspedes humanos y bovinos han sido realizados en Argentina mediante técnicas basadas en el ADN. El poder de discriminar cepas de *S. aureus* de distintos orígenes por RAPD-PCR usando un solo cebador resultó restringido, pero los datos obtenidos usando la combinación de cebadores seleccionados mostraron claramente que es posible diferenciar cepas de *S. aureus* aisladas de huéspedes humanos y bovinos. El concepto que las cepas de *S. aureus* aisladas de diferentes huéspedes difieren unas de otras fue apreciado por Madison en 1935 (1935). Varios informes han demostrado que el origen de *S. aureus* puede ser determinado mediante pruebas bioquímicas (Hájek y Marsálek, 1971; Devriese, 1984). Trabajos recientes han encontrado importantes diferencias genéticas entre las poblaciones humanas y bovinas; recientemente Herron y col. (2002) realizó un estudio genómico comparativo entre un clon asociado a mastitis, RF122 y los clones humanos recientemente secuenciados, Mu50 y N315. En dicho estudio se identificó una isla de patogenicidad SaPIbov, la cual incluye factores de virulencia y toxinas. En la isla se encontraron secuencias no descubiertas en los clones humanos, lo cual estaría indicando la presencia de secuencias específicas en el clon bovino. Entre los genes involucrados se encontraría el gen *seI*, cuyo producto es similar a la enterotoxina I y el gen *bap*, un gen involucrado en la formación de biofilm. Los resultados obtenidos en este trabajo están de acuerdo con Kapur y col. (1995), quien informó que la transferencia de cepas de *S. aureus* entre huéspedes humanos y bovinos parece ser limitada al analizar 200 cepas por enzimas multilocus. La especialización a nivel de huéspedes también fue informada por Kreiswirth y col. (1983) quien observó que el gen TSST-1, involucrado en el síndrome del shock tóxico es genotípicamente diferente en cepas aisladas de ovinos y de humanos. Zadoks y col. (2000) confirma la asociación huésped específica en cepas aisladas de humanos y bovinos mediante ensayos de campos pulsantes. Rivas y col. (1997) en un análisis de cepas de *S. aureus* y *S. agalactiae* aisladas de leche bovina mediante ribotipificación informa que ninguno de los 18 ribotipos encontrados en cepas de *S. aureus* han sido previamente encontrados en aislados humanos. Por otro lado, varios estudios sugieren que las manos de los tamberos están implicadas en la diseminación de cepas humanas a bovinos y en la consecuente producción de mastitis (Fox y col., 1991).

En general las cepas aisladas de alimentos y de humanos portadores mostraron pocos genotipos al ser analizadas con cada cebador por separado y con la combinación de ambos. Dichos genotipos fueron discriminados de igual forma con los otros cebadores analizados. Las



cepas aisladas de helados, fueron todas similares, indicando una única posible fuente de contaminación.

Es importante destacar que las cepas aisladas de alimentos fueron genotípicamente semejantes a las cepas aisladas de portadores. Este resultado podría estar indicando que la contaminación de los alimentos proviene de portadores sanos.

Los resultados obtenidos mediante la construcción de dendrogramas y análisis de coordenadas principales indicarían que las cepas analizadas por RAPD-PCR con los tres cebadores corresponden a tres poblaciones genotípicamente diferentes de acuerdo al origen. También resulta importante destacar que los resultados obtenidos por RAPD-PCR mostraron que no existe asociación entre genotipos y biotipos. Estos resultados contrastan con lo observado para el cebador OL11 y con los resultados hallados por Hennenike y col. (2003).

5- ANALISIS DE CEPAS DE *S. aureus* POR REP-PCR

Del análisis de las cepas humanas por REP-PCR se observó que todas las cepas compartían una banda de 350 bp. Este resultado es similar al mostrado por van der Zee y col. (1999). También se observaron asociaciones entre algunos genotipos y determinados ecotipos, entre genotipos y perfiles de resistencia a antibióticos y entre genotipos y sitio de infección. Los resultados obtenidos parecen indicar que los elementos repetidos en *S. aureus* usados como blancos podrían exhibir variación geográfica en su polimorfismo.

Al analizar las cepas aisladas de huéspedes bovinos se encontró una gran diversidad de genotipos entre los aislados bovinos de la cuenca lechera central. Los genotipos pudieron dividirse de acuerdo al origen de aislamiento, mostrando que en cada región se encuentran genotipos prevalentes. A pesar del gran número de cepas diferentes dentro de los tambos, se encontraron perfiles predominantes en algunos tambos de la región de Córdoba, sugiriendo que los casos podrían haber sido causados por unos pocos clones. Estos resultados están de acuerdo con la teoría que la mastitis bovina es un problema endémico en el cual la infección se disemina mediante transmisión vaca a vaca (Magee y col., 1984; Zadoks y col., 2000). Por otro lado, no se encontró ningún perfil rep en los tambos de la región de Buenos Aires. Este resultado podría deberse al hecho que pocas cepas fueron aisladas en cada tambo. También es importante destacar que cepas de tambos ubicados en la región de Córdoba, fueron genotípicamente similares a las cepas aisladas de tambos de la región de Buenos Aires, a pesar que la distancia entre tambos es de 500 Km. Por lo tanto aunque son semejantes

genéticamente, no están epidemiológicamente relacionadas. Este resultado sugeriría que ciertas cepas tendrían una predilección para causar mastitis.

Resulta importante destacar que no se encontró asociación entre genotipos rep y perfil de antibióticos.

Los resultados obtenidos con esta técnica mostraron que las cepas humanas o bovinas pudieron separarse de acuerdo al origen, al igual que con la técnica de RAPD-PCR. También se observó que el índice de diversidad fue diferente entre las cepas de ambos grupos, este resultado nos estaría indicando que los genotipos que producen enfermedad en un huésped no la producen en el otro. Resultados similares al ensayar la técnica de REP-PCR fueron informados por Jersek y col. (1999), quien ensayó cepas de *Listeria monocytogenes* aisladas de huéspedes humanos, animales y de alimentos.

Los genotipos de las cepas aisladas de portadores y alimentos presentaron perfiles similares, indicando la presencia de un perfil predominante, el cual es diferente a los aislados de bovinos y humanos.

Al realizar el dendrograma con los datos de todas las cepas ensayadas se observó que la técnica de REP-PCR fue capaz de discriminar a los aislados de acuerdo al origen. Estos resultados concuerdan con otros previamente discutidos. La importancia de estos datos radica en que la técnica de REP-PCR amplifica secuencias repetidas presente en distintos genes, lo cual estaría sugiriendo que las secuencias varían en número y tamaño según el origen de cada cepa.

Los resultados obtenidos mediante la técnica de RAPD-PCR y REP-PCR fueron preliminarmente confirmados mediante un ensayo de campos pulsantes. Los resultados generales coinciden con los resultados obtenidos mediante la técnica de campos pulsantes. Los sitios de restricción de la enzima *SmaI* están altamente conservados *per se* en las cepas de *S. aureus* (Wielders y col., 2002), y esto hace que la técnica tenga un elevado poder de discriminación; por lo tanto la diferencia encontrada en las cepas aisladas de distintos huéspedes estaría indicando la presencia de genotipos diferentes de acuerdo a su origen. Estos resultados indican que las técnicas de RAPD-PCR y REP-PCR podrían ser de utilidad para separar aislados en función del origen.

Resulta interesante apuntar que, en general, los perfiles genotípicos fueron analizados a una similitud genética relativa del 100%, pero si el punto de corte es al 80%, como se hace en la

mayoría de los trabajos informados, se pueden observar pocos genotipos. Estudios recientes han enfatizado sobre la naturaleza clonal de *S. aureus* y sugieren que un número limitado de clones serían de relevancia clínica. Por ejemplo, Booth y col. (2001), caracterizó 405 cepas de *S. aureus* por campos pulsantes e identificó 91 perfiles distintos, 5 de los cuales fueron los responsables de más del 65 % de las infecciones. Los resultados dependen de la técnica utilizada y los criterios de interpretación al realizar el análisis.

6- MARCADORES MOLECULARES

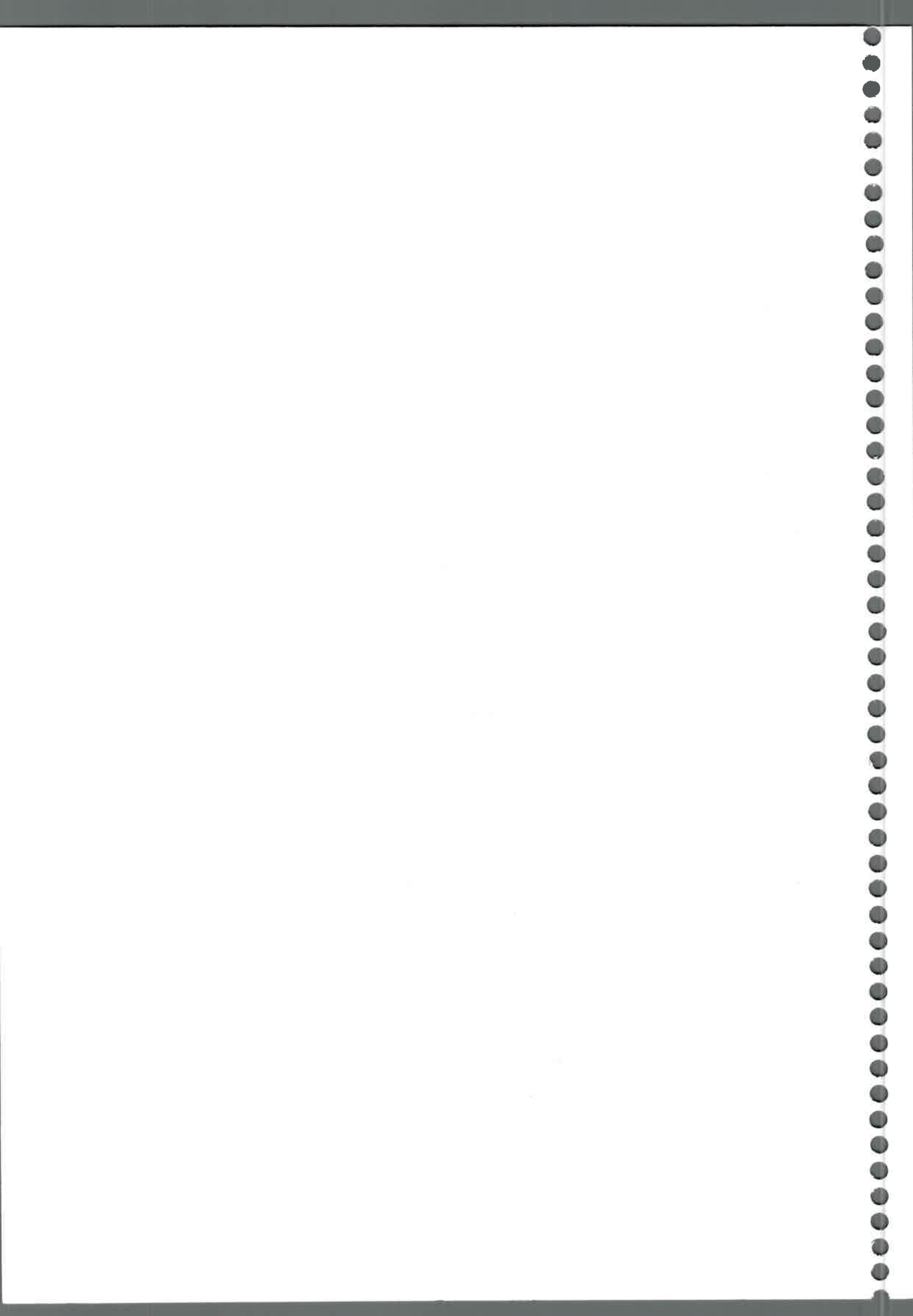
Al realizar los ensayos con mezclas de ADN mediante RAPD-PCR con el cebador OPL13 se encontraron bandas fuertes y nítidas que se diferenciaban de acuerdo a las poblaciones y de acuerdo a la virulencia de las cepas ensayadas. Resultados similares fueron obtenidos con la técnica de REP-PCR. La importancia de estos datos radica en que la mayoría de las cepas aisladas de humanos son semejantes entre sí, pero diferentes a las aisladas en bovinos y viceversa. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores, en los cuales se informa sobre la naturaleza clonal de *S. aureus* (Kreiwirth y col., 1993).

Las bandas podrían ser utilizadas como marcadores moleculares en cepas de *S. aureus* para la identificación rápida. Previamente sería adecuado un secuenciamiento de dichas bandas para determinar los genes implicados.

7- ANÁLISIS MOLECULAR DE GENES RELACIONADOS A VIRULENCIA

La amplificación del gen que codifica para la región de unión a inmunoglobulinas de la proteína A reveló un tamaño de aproximadamente 900 bp para la mayoría de los aislados analizados. De acuerdo a estudios previos, el tamaño de dicho fragmento indica que el gen de la proteína A contiene 5 unidades repetidas (Shopsin y col., 1999).

Por otro lado, la amplificación de la región variable X reveló diferencias en el tamaño del fragmento para las cepas humanas y bovinas. Dicha región es caracterizada por un número variable de unidades repetidas las cuales evolucionan rápidamente y parecen ser adecuadas para discriminar cepas de *S. aureus* aisladas en un período de tiempo corto (Frenay y col., 1996; Toshkova y col., 2001). En el presente trabajo se encontró que en general, las cepas bovinas no poseen polimorfismos. Estos resultados están de acuerdo con Akineden y col.



(2001) al estudiar los polimorfismos del gen *spaA* en las cepas bovinas. De acuerdo a esto, las cepas cercanamente relacionadas son las responsables de los casos de mastitis subclínica. Estos resultados coinciden con otros informes, en los cuales se substancia la existencia de que un número limitado de clones o genotipos de *S. aureus* estarían especializados y serían los responsables en producir la enfermedad (Kapur y col. 1995; Zadoks y col. 2000; Stephan y col. 2001). Por otro lado, diferentes genotipos de *S. aureus* podrían causar infecciones en huéspedes humanos.

Resulta importante destacar que los resultados indican que las cepas humanas y bovinas pudieron ser diferenciadas en dos poblaciones diferentes de acuerdo a los resultados obtenidos a partir del polimorfismo de la fracción X del gen *spaA*.

Frenay y colaboradores (1996), en un estudio sobre cepas MRSA analizando el gen *spaA* determinaron que las cepas con más de 11 unidades repetidas en la región X tienden a ser epidémicas, mientras que la presencia de 7 o menos unidades repetidas indica que se trata de cepas no epidémicas o esporádicas. La presencia de 11 unidades repetidas en la región X hace a una mayor longitud de la región de unión Fc a la superficie celular, la cual favorecería la colonización e infección. Esto sería de fundamental importancia en las cepas epidémicas (Hoefnagel-Schuermans y col., 1997). En este trabajo y de acuerdo a los datos anteriores, las cepas MRSA halladas serían esporádicas; sólo tres cepas de alimentos, susceptibles a metilicina, poseen 11 unidades repetidas, lo cual indicaría una tendencia epidémica. Este resultado está de acuerdo ya que esas cepas podrían haber originado un brote alimenticio.

La producción de coagulasa es el criterio principal usado en el laboratorio de microbiología clínica para la identificación de cepas de *S. aureus* aisladas de infecciones en humanos. Existen numerosas formas alélicas del gen de la coagulasa y cada aislado con diferentes alelos, produce una o más de estas variantes enzimáticas. Se han determinado al menos 8 enzimas diferentes mediante serología. En este trabajo pudieron identificarse las 8 formas alélicas del gen. En los distintos ensayos, en algunas cepas, se obtuvieron más de una banda amplificada. Estos resultados coinciden con Goh y col. (1992) y sugieren la presencia de más de una forma alélica del gen de la coagulasa. La amplificación del gen *coa* mostró una alta diversidad, aunque pudieron encontrarse perfiles predominantes en cepas de cada origen. El perfil polimórfico de 5 unidades repetidas fue predominante en cepas aisladas de episodios clínicos. Shopsis y col. (2000) encontró diferentes regiones polimórficas, las cuales variaron en tamaño, de 3 a 7 unidades repetidas, siendo el perfil predominante el de 5 unidades repetidas. Los datos podrían indicar la presencia de diferentes variantes enzimáticas de este factor de

virulencia en los distintos aislados. En la literatura se informa que el reloj molecular del gen de la coagulasa evoluciona mucho más lento que otros *loci*, como *clfA*, por lo tanto el gen coagulasa muestra pequeña variación entre las cepas no relacionadas (Sabat y col., 2003). De acuerdo a estos resultados las cepas ensayadas podrían no estar relacionadas epidemiológicamente. Por otro lado, resulta importante destacar que la tipificación mediante amplificación el gen *coa* pudo distinguir aislados con el mismo perfil *spa*.

La amplificación del gen de adherencia a fibrinógeno no mostró diferencias entre los aislados de *S. aureus* de diferentes orígenes. Esto indica que el gen *clfA* es un marcador altamente estable, como fue informado en la literatura (Herron y col., 2002).

En la bibliografía se describen más de 11 tipos antigénicos diferentes, siendo *cap 5* y *8* los prevalentes (Karakawa y Vann, 1992). Un 62% de las cepas ensayadas pudieron ser amplificadas con los cebadores correspondientes a los genes *cap5* y *cap8*. *cap5* estuvo presente en cepas humanas y bovinas, mientras que *cap8* no pudo ser hallado en cepas bovinas. El 38% de las cepas ensayadas fueron negativas para los polisacáridos capsulares 5 y 8, lo que indicaría que estas cepas tendrían otros prototipos de polisacáridos capsulares. Booth y col (2001) en un estudio realizado en cepas de *S. aureus*, encontró que el 75% de los aislados clínicos fueron *cap 5* y *cap 8*. Sordelli y col. (2000) en un estudio realizado en 195 cepas de *S. aureus* aisladas de bovinos en Argentina encuentra una prevalencia del 14%. Los datos obtenidos, junto con los otros previamente informados en la literatura indican que existen importantes diferencias en la prevalencia del tipo de cápsula (*cap 5* y *cap 8*) entre las cepas bovinas aisladas de distintas regiones geográficas. El tipo de cápsula es usado para la formulación de vacunas contra mastitis. La ausencia de polisacárido capsular 8 en cepas bovinas, indicaría que el antígeno capsular 5 podría ser un buen candidato para la formulación de una vacuna contra mastitis en la región de Buenos Aires. Por otro lado, este hecho junto con el bajo porcentaje de cepas positivas para CAP 5 pone en duda el rol de estos dos tipos de polisacáridos capsulares como factores de virulencia en las infecciones causadas por *S. aureus*.

Se encontró que un bajo porcentaje de cepas (11%) fueron positivas para la amplificación del gen *cna*, este dato está de acuerdo con la observación que la mayoría de las cepas no codifican el gen *cna* (Smeltzer y col., 1997). Solo las cepas que causan infecciones musculoesqueléticas portan el gen *cna*, debido a que la mayoría invariablemente se une a

colágeno. En este trabajo todas las cepas aisladas de episodios clínicos en humanos amplificaron el gen *cna*, lo que indicaría que quizá estas cepas han estado asociadas anteriormente con infecciones musculares. Resulta interesante destacar que 2 cepas fueron aisladas de hemocultivo y Hienz y col. (1996) en un trabajo en modelos animales describe la importancia de la proteína de unión a colágeno como factor de virulencia en la endocarditis.

Se encontró un elevado número de cepas positivas (85%) para el gen *sea*, estos resultados no coinciden con estudios previos que demuestran la presencia de dicho gen entre el 12% y el 38% en las cepas analizadas (Peacock y col, 2002; Nashev y col. 2004). el-Ghodban y col. (1999), en un estudio en cepas aisladas de alimentos y episodios clínicos informa la presencia de enterotoxina A (SEA) en solo el 11.1% de los aislados. La importancia de detectar la enterotoxina A en cepas de *S. aureus*, especialmente en cepas aisladas de alimentos contaminados, radica en que dicha toxina es la responsable de enfermedad alimentaria. El gen *sea* estaría en un segmento de ADN movilizable y uno de los lugares de inserción sería el gen que codifica para la β -hemolisina, por lo tanto si el gen *sea* se inserta en el gen de la β -hemolisina, la producción de β -hemólisis en agar de carnero al 5% sería nula. En dicho estudio el 97% de las cepas resultaron poseer el gen *sea* y el 85% mostraron β -hemólisis en placa. Estos resultados nos estarían indicando que el gen *sea* de las cepas ensayadas en el presente estudio no se encuentra inserto en el gen que codifica para la hemolisina β .

Se encontraron diferentes clases de *agr* entre las cepas de *S. aureus* aisladas de diferentes orígenes sugiriendo que el gen *agr* tiene diferentes polimorfismos en las cepas de *S. aureus* de acuerdo al origen de aislamiento. Los resultados obtenidos coinciden con Gilot y van Leeuwen (2004), quien en un trabajo reciente encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre clases de *agr* con infecciones en un huésped específico.

El 50% de las cepas resistentes a metilicina pertenecían al grupo *agr* clase III, estos resultados son diferentes a los informados por Strommengerb y col. (2003) quien no encontró relación entre los grupos específicos de *agr* y la resistencia a metilicina.

El gen *hld* codifica para el RNAIII, el mismo tiene una estructura secundaria compleja. Existen evidencias que la estructura está ampliamente conservada entre las distintas especies de estafilococos, pero su secuencia nucleotídica es variable (Benito y col., 1998). En el presente trabajo se obtuvieron productos de amplificación en el 77% de las cepas ensayadas. Dichos



resultados sugieren la existencia de polimorfismos en el gen *hld* entre las cepas analizadas.

Los resultados obtenidos al amplificar el gen *sae* muestran que solo el 62% de las cepas ensayadas presentaron fragmentos de amplificación. Estos datos estarían indicando dos posibilidades, (1) que el gen *sae* no se encuentre en todas las cepas ensayadas. Para confirmar los datos sería necesario realizar un Southern blot utilizando digestos de ADN de cepas cuyos productos de amplificación resultaron negativos por PCR e hibridando con el gen *sae* marcado. Nuestros resultados concuerdan con estudios realizados en el gen regulatorio *agr* (Jarraud y col., 2000). Informes recientes sobre la distribución de dicho gen indican que en la regulación de *S. aureus* están involucrados varios genes los que posiblemente se encuentren en islas de patogenicidad (SaPIs) y se transfieren en forma horizontal entre las cepas (Moore y Lindsay, 2001). Lo que posiblemente podría indicar la ausencia de algunos genes en determinadas cepas. Otros informes sugieren que un alto número de genes de virulencia se encuentran en elementos genéticos móviles, Moore y Lindsay (2001) demuestra que los genes *lukE-splB*, *seg-sei* y *seh* (genes regulatorios) serían elementos genéticos similares que pueden ser adquiridos o perdidos. (2) El gen *sae* podría ser polimórfico, por eso no siempre es amplificable con los cebadores empleados. Los cebadores empleados fueron diseñados de acuerdo a la secuencia determinada por Giraudo y col. (1997) en la cepa de nuestro laboratorio (Gen Bank accession number AF129010), aunque en un trabajo realizado por Steinhueber y col. (2003) al realizar el secuenciamiento de su cepa, éste no coincide con la secuencia de bases informada por Giraudo y col. (según Steinhueber y col., Gen Bank accesión nº AJ 556794, cepa Newman; AJ 55 6795 cepa ISP479). Las diferencias en las bases se encuentran en la región terminal del gen próxima a la región *cbs*. Esta opción sería la más confiable, ya que al amplificar con los cebadores *S1* y *S3* la región *saeR*, esta se amplifica en algunas cepas, pero cuando se amplifica la misma cepa con los cebadores *S1* y *S4* no siempre pudo encontrarse producto. Esto estaría indicando que si hay una primera amplificación de un segmento del gen, debería haber una segunda amplificación del gen completo en la misma cepa, o sea el gen se encontraría presente; si no lo hubiese, el cebador *S4* no sería complementario a la secuencia diana de esa cepa, lo que sugiere la existencia de polimorfismos en esa región.

La hemolisina α de *S. aureus* se caracteriza por tener múltiples formas moleculares (Bermheimer, 1988), estas formas son isotoxinas o diferencias conformacionales de una misma proteína. La toxina interacciona con las células, libera iones potasio y finalmente produce

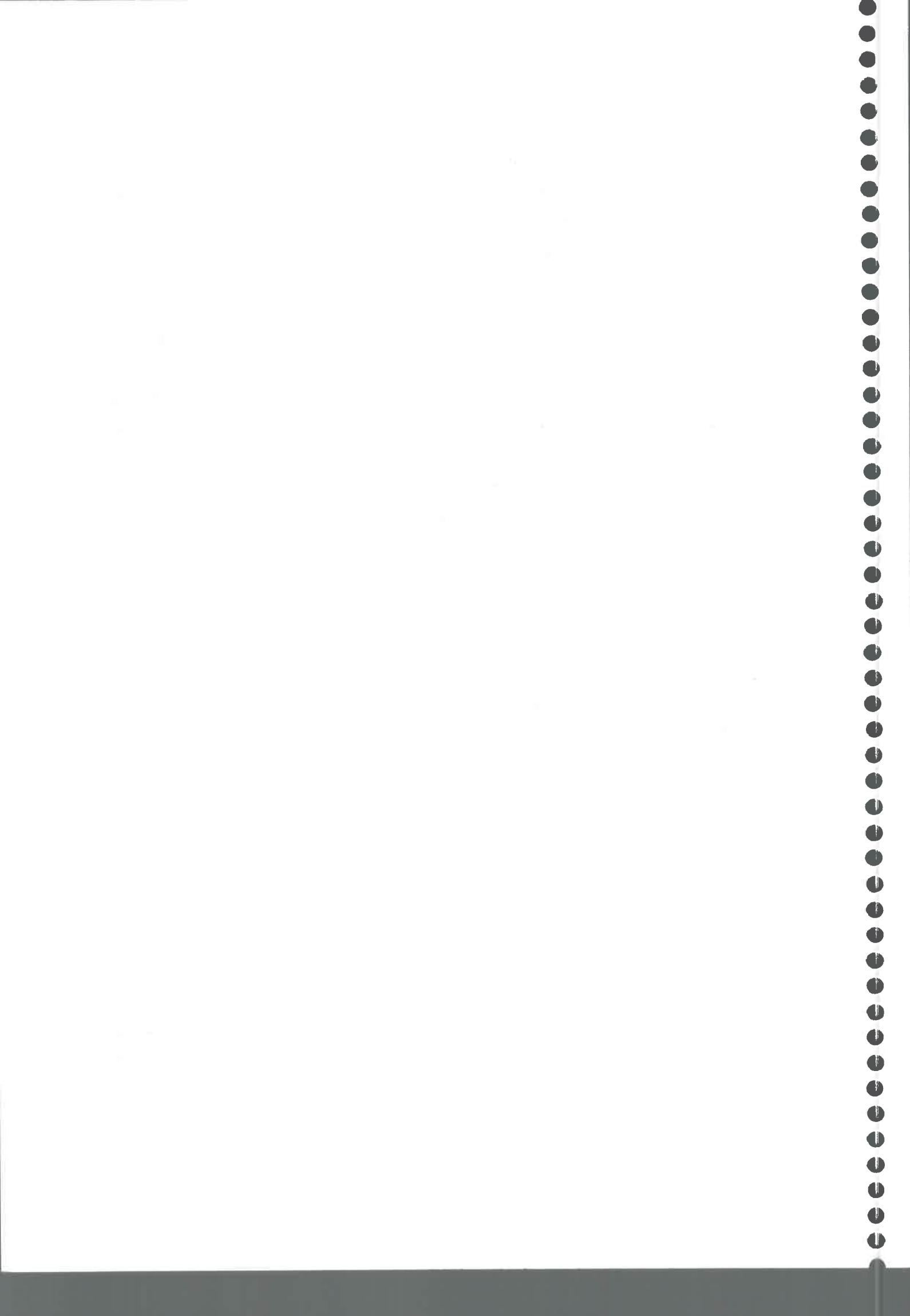
hemólisis.

La hemolisina β es una fosfolipasa C capaz de degradar esfingomielina de las membranas celulares. Los eritrocitos de carnero y bovino son muy sensibles a la lisis de β lisina debido al alto contenido y localización superficial de esfingomielina. La lisis es caracterizada por la diferencia de temperatura frío-calor.

Ambas hemolisinas junto con la coagulasa son reguladas por el gen *sae*, debido a esto se buscaron asociaciones entre niveles cualitativos de coagulasa y hemolisinas versus presencia - ausencia de los productos de amplificación del gen *sae* por PCR. En general, se encontró una relación entre presencia del gen y niveles de coagulasa y α o β hemolisina. Estos resultados sugieren que si el gen *sae* no se encuentra presente en todas las cepas, los niveles de las exotoxinas podrían variar de acuerdo a la presencia o ausencia del gen. Y si el gen tiene polimorfismos, lo cual podría ser la hipótesis más adecuada, los mismos podrían estar inactivándolo o bien produciendo una variante alélica del producto de dicho gen que actuaría en forma negativa sobre coagulasa y sobre las hemolisinas α y β .

+ PODER DE DISCRIMINACIÓN

El índice de discriminación de una técnica aplicada a la tipificación bacteriana puede ser usado para comparar diferentes métodos. El análisis de plásmidos tiene dos importantes desventajas, primero, que algunos aislados no poseen plásmidos y segundo que los plásmidos son inestables. Por ejemplo, reordenamientos o deleciones de secuencias son eventos comunes en plásmidos, como también la pérdida total del mismo en las cepas bacterianas. Por estas razones, los perfiles de antibiogramas no son caracteres estables y no son confiables para la tipificación epidemiológica en aislados de *S. aureus*. La biotipificación es una técnica fenotípica y los marcadores fenotípicos son variables en el tiempo. La tipificación mediante RAPD-PCR o REP-PCR es útil para obtener información epidemiológica, pero en la amplificación son producidos un gran número de fragmentos los cuales son difíciles de interpretar. Además con estas técnicas solo se analiza un 10% del genoma de la bacteria. Actualmente la tipificación secuencias repetidas como los genes *spaA*, *coa*, *cfIA*, y *cna*, entre otros, se están utilizando ya que son técnicas simples y rápidas. Además, como se conoce la variación evolutiva de estos genes, es fácil hacer una interpretación de los perfiles. La técnica



de campos pulsantes es considerada una de las mejores para realizar análisis entre diferentes aislados, pero es una técnica muy laboriosa y costosa.

Aarestrup y col. (1999) compara el poder de discriminación de diferentes técnicas de tipificación, como antibiograma, biotipo, fagotipo, perfil plasmídico y ribotipo para cepas de *S. aureus* concluyendo que el ribotipo fue el más discriminatorio. Los resultados hallados por Rivas y col. (1997) están de acuerdo con Aarestrup y col. (1999) ya que indican que el ribotipo alcanza índices discriminatorios de aproximadamente el 95%. Recientes estudios demuestran que la electroforesis por campos pulsantes es la técnica más discriminatoria, sin embargo, en este trabajo se encontraron altos índices de discriminación para RAPD-PCR y REP-PCR.

En este trabajo se analizó la tipeabilidad, reproducibilidad, poder discriminatorio, facilidad de uso y de interpretación de cada uno de los métodos ensayados. Contrariamente a lo pensado, el sistema de biotipificación también mostró un buen índice de discriminación (80%), lo cual está indicando que dicho sistema a pesar de haberse desarrollado hace ya varios años y basarse en pruebas bioquímicas es un buen sistema para diferenciar aislados de *S. aureus*. RAPD-PCR y REP-PCR fueron más discriminatorios al compararlos con el biotipo (95%-98% y 98%). Es importante destacar que todos los cebadores pudieron ensayarse en ADN de cepas de *S. aureus* aisladas de huéspedes humanos, bovinos y de alimentos. Los métodos de amplificación de secuencias repetidas mostraron buenos resultados, pudiendo diferenciar a las cepas.

Las pruebas basadas en el genotipo están sujetas a pocos efectos ambientales comparadas con las pruebas fenotípicas, por lo tanto RAPD-PCR y la amplificación de secuencias repetidas en genes de virulencia podrían ser métodos de elección para diferenciar y agrupar aislados de *S. aureus*. Las ventajas de ambos métodos son la simplicidad, precisión y la velocidad, comparados con otros métodos moleculares como la electroforesis de campos pulsantes.

En este estudio todas las técnicas empleadas, a pesar de sus ventajas y desventajas, arrojaron buenos resultados y en general los datos obtenidos de cada técnica fueron acordes entre sí.

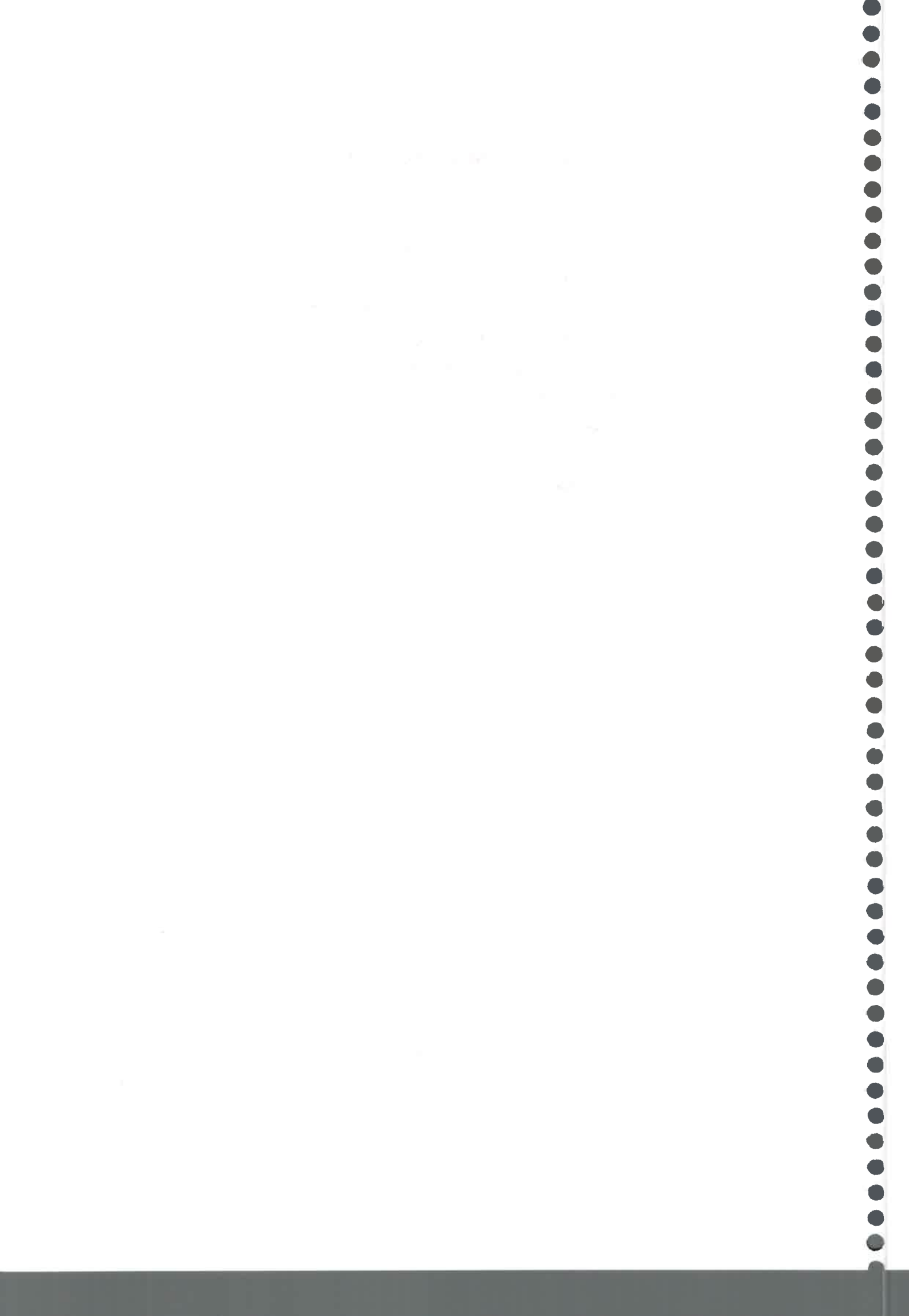
ASOCIACIONES GENERALES

Al analizar los resultados obtenidos según los distintos métodos: se observó que no hubo correlación entre los perfiles de RAPD-PCR y los biotipos. Sin embargo el análisis de biotipificación y REP-PCR demostró algunas asociaciones. Estos resultados coinciden con Hennekinne y col., (2003) quien al analizar 73 cepas de *S. aureus* aisladas de diferentes orígenes mediante electroforesis de campos pulsantes y biotipificación, observó que el 86% de las cepas que presentaron el mismo biotipo pertenecían al mismo grupo de perfiles obtenidos mediante la técnica molecular de electroforesis de campos pulsantes fueron agrupadas en el mismo grupo de perfiles obtenidos mediante la técnica de campos pulsantes.

Se encontraron pocas relaciones entre el perfil de antibióticos y RAPD-PCR, las cuales estadísticamente no fueron significativas; por el contrario se encontraron relaciones importantes al analizar las cepas por REP-PCR. No se observaron relaciones entre los genotipos y los sitios de infección ni por RAPD-PCR ni por REP-PCR. Los datos obtenidos usando la combinación de cebadores seleccionados muestran claramente que es posible diferenciar cepas de *S. aureus* aisladas de huéspedes humanos y bovinos.

La técnica de REP-PCR discrimina las cepas de manera diferente a la técnica de RAPD-PCR, aunque los resultados generales coinciden con los obtenidos por RAPD-PCR. Se observó que las cepas que portaban el gen *agr* clase 1 fueron las cepas menos virulentas, ya que correspondieron a cepas humanas aisladas de portadores y cepas bovinas con baja resistencia a antibióticos en general. Más del 50% de estas cepas se relacionan con el perfil *coa* 7, sugiriendo tal vez una asociación entre clase de *agr* y coagulasa (cabe recordar que *agr* regula exoproteínas). Las cepas *agr* clase I y clase II estuvieron asociadas a la presencia del tipo de polisacárido capsular 5 y las cepas *agr* clase II estuvieron asociadas a un ecotipo huésped específico. Las cepas humanas y bovinas pudieron ser diferenciadas en dos poblaciones diferentes de acuerdo a los resultados obtenidos a partir del polimorfismo de la fracción X del gen *spaA*. Algunas de las asociaciones encontradas entre los distintos genes tienen un fundamento de acuerdo a lo informado en la bibliografía, muchas no pueden fundamentarse debido a la complejidad del genoma de *S. aureus*.

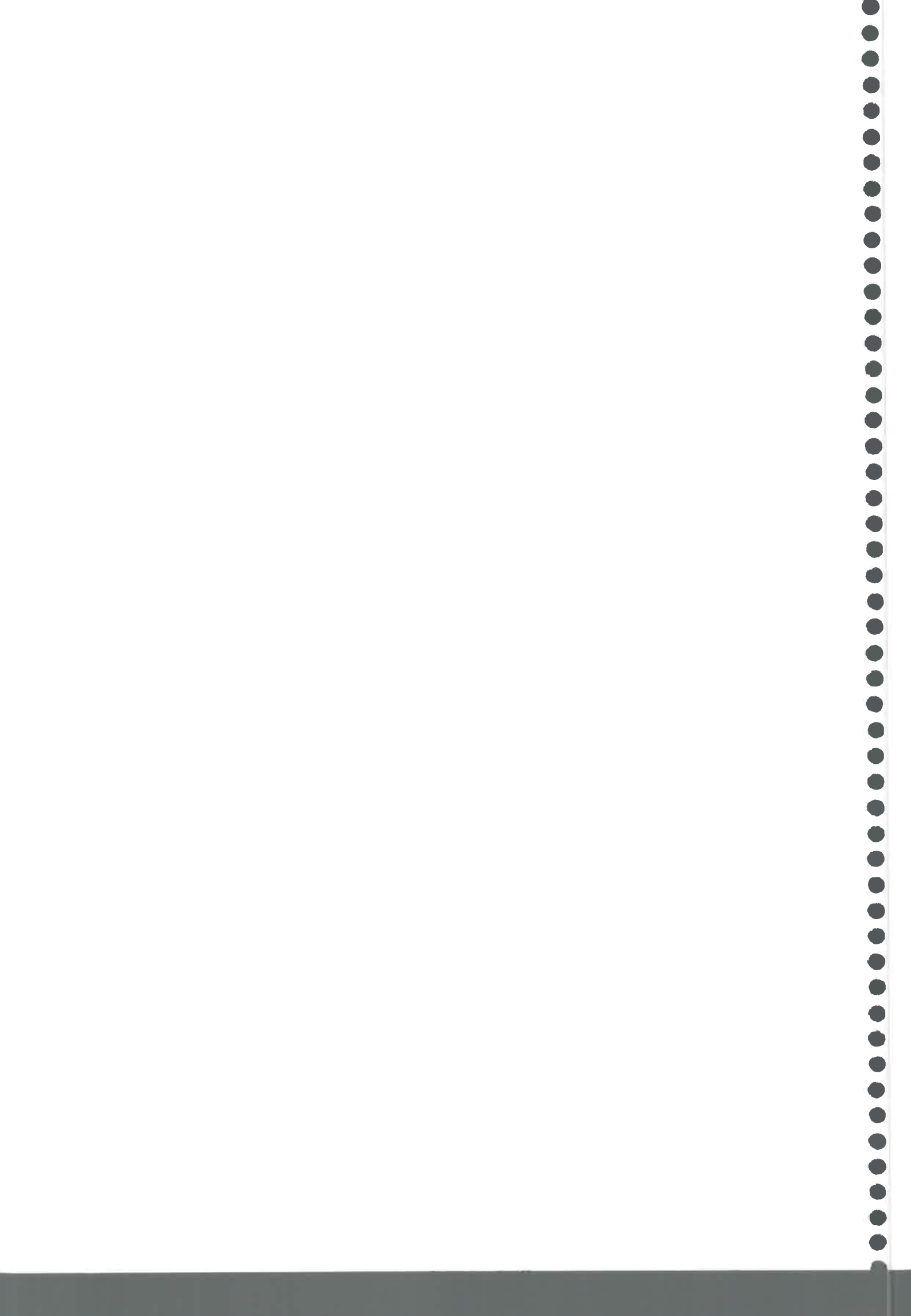
Cabe destacar que las diferentes características que se encontraron entre las cepas aisladas de distintos orígenes podrían tener relación con la virulencia, ya que las cepas fueron virulentas dependiendo de su origen. Por ejemplo, las cepas aisladas de episodios clínicos en



humanos fueron más virulentas que las cepas aisladas de mastitis y que las cepas aisladas de portadores sanos y alimentos. Aunque para realizar un completo análisis de virulencia correspondería ensayar las cepas en modelos animales.

S. aureus tiene una elevada variabilidad genética, debida a fenómenos de transferencia horizontal y distintos eventos de recombinación, la cual se ve reflejada en el alto número de perfiles genómicos obtenidos en las técnicas moleculares.

Se describe que cuando las bacterias causantes de enfermedades encuentran un nuevo obstáculo intercambian ADN con sus vecinas para adquirir genes necesarios para superar el obstáculo. Se conoce que *S. aureus* se ha adaptado repetidamente a nuevos medios y condiciones. Musser y col. (1992) sugieren que las bacterias se han adaptado a diferentes cambios mediante la incorporación de genes contingentes en múltiples ocasiones, mostrando así la facilidad de que aparezcan nuevas cepas y se diseminen en la población. Actualmente se está estudiando si determinadas cepas están adaptadas para transferir ADN o incorporarlo, si es así, la vigilancia epidemiológica se encontraría en este tipo de cepas. Los resultados obtenidos en el presente trabajo contribuirían a la búsqueda de este tipo de cepas y por lo tanto los mismos serían de importancia en la vigilancia epidemiológica.



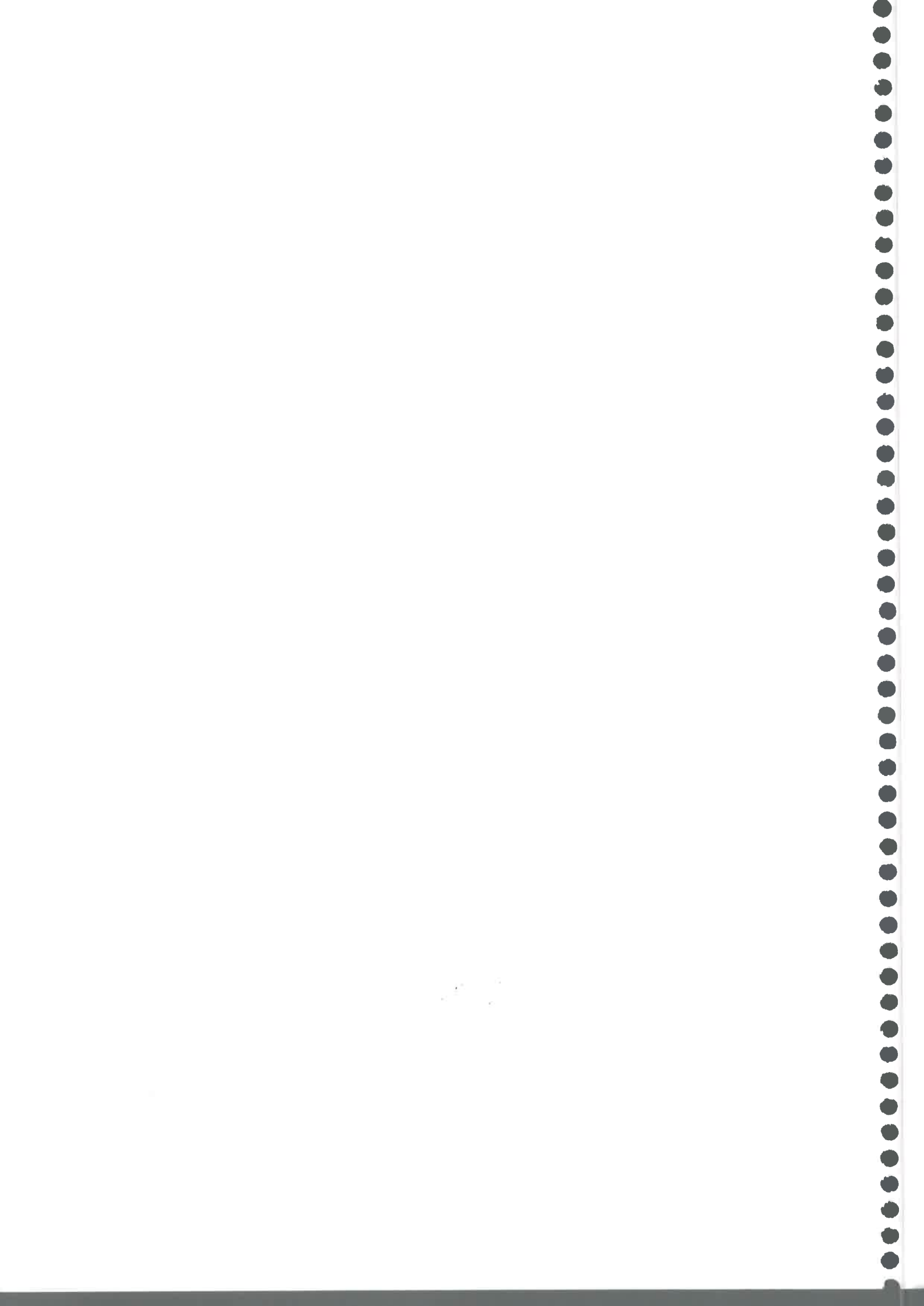
IMPLICANCIAS

Los datos obtenidos a partir de los genotipos permiten realizar inferencia de relaciones epidemiológicas, pueden proveer los estándares de un sistema taxonómico para clasificar los agentes causantes de infección intramamaria y facilitar estudios de inferencias de relaciones epidemiológicas. Además estas bases de datos podrían facilitar comparaciones entre cepas humanas y bovinas, como así también establecer programas de control en hospitales y tambos.

Los resultados podrían ser importantes para construir bases de datos, a las cuales podría incorporarse los resultados obtenidos por el sistema de biotipificación y la resistencia a antibióticos. En una base de datos se cargaría la información genética de cada cepa analizada según las distintas técnicas; esto permitiría monitorear las cepas de *S. aureus*, por ejemplo conocer si una cepa causante de infección en un tambo a determinado tiempo es semejante a la cepa que causó infección en el mismo tambo en otro tiempo. Y de esta forma establecer programas de control. El propósito de un programa de control debe apuntar a identificar el origen de los problemas y a establecer un plan de acción que sea más efectivo e incremente sus ganancias. Tanto para el tambo como para la clínica, las medidas recomendadas deben ser prácticas y sencillas con resultados visibles.

Los resultados obtenidos representan un valioso aporte al conocimiento de la epidemiología de *S. aureus* y son relevantes para avanzar en otras líneas de investigación debido a que: (1) han permitido elucidar ciertas relaciones epidemiológicas, (2) contribuyen a la selección de cepas de *S. aureus* con características relevantes para ser utilizadas en el diseño de vacunas contra la mastitis bovina, (3) posibilitan un mejor conocimiento, tanto a nivel fenotípico como genotípico de cepas de *S. aureus* de distintos orígenes y de distintas regiones, (4) estudio de: a) cepas MRSA; b) presencia y/o polimorfismos del gen *sae* en las cepas aisladas de diferentes orígenes; c) el análisis de las bandas posibles marcadores moleculares de origen y de virulencia y (5) han permitido la obtención de marcadores moleculares, los cuales podrían ser de utilidad en esquemas de identificación de cepas de *S. aureus* mediante métodos rápidos, lo cual permitiría desarrollar un método de detección en cepas de *S. aureus* para transferencia tecnológica a la industria láctea.

Conclusiones



A partir del presente trabajo se obtuvieron las siguientes conclusiones:

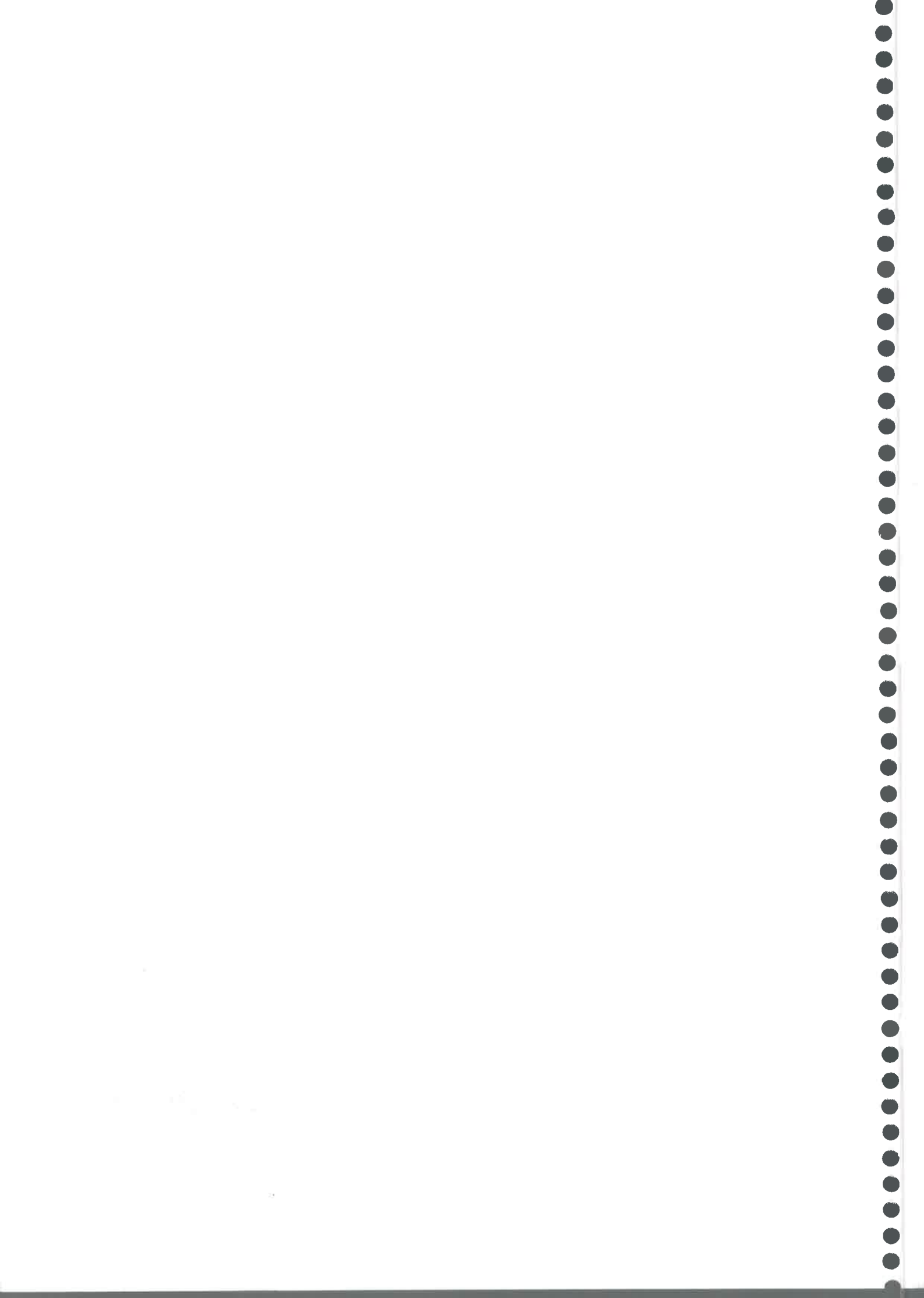
- Independientemente de su origen de aislamiento, todas las cepas pudieron ser tipificadas mediante las técnicas empleadas.
- Todas las técnicas pudieron diferenciar, en mayor o en menor medida a las cepas de acuerdo a su origen de aislamiento.
- Los ecotipos del 42% de las cepas se corresponden con el origen de las mismas, indicando una asociación huésped-específica.
- Se encontró un alto porcentaje de resistencia a penicilina, tanto en cepas aisladas de huéspedes humanos como de bovinos.
- Tres poblaciones genotípicamente diferentes de acuerdo al origen (humano, bovino y alimentos) fueron identificadas a través del análisis molecular.
- Las cepas bovinas mostraron con cada uno de los cebadores y con la combinación de ellos una mayor diversidad genética que las cepas humanas.
- Los resultados obtenidos por RAPD-PCR y rep-PCR en cepas bovinas demostraron la existencia de un limitado número de clones especializados en producir mastitis bovina.
- Las cepas humanas y bovinas pudieron ser diferenciadas en dos poblaciones diferentes de acuerdo a los resultados obtenidos a partir del polimorfismo de la fracción X del gen *spaA*.
- Los datos del gen *coa* podrían indicar la presencia de diferentes variantes enzimáticas de este factor de virulencia en los distintos aislados.
- Un 62% de las cepas ensayadas pudieron ser amplificadas con los cebadores correspondientes a los genes *cap5* y *cap8*. *cap5* estuvo presente en cepas humanas y bovinas, mientras que *cap8* no pudo ser hallado en cepas bovinas.
- Se encontraron diferentes clases de *agr* entre las cepas de *S. aureus* aisladas de diferentes orígenes sugiriendo que el gen *agr* tiene diferentes polimorfismos en las cepas de *S. aureus* de acuerdo al origen de aislamiento.
- La amplificación del gen *sae* demostró que solo el 62% de las cepas ensayadas presentaban fragmentos de amplificación, lo cual estaría sugiriendo la presencia de variantes alélicas en dicho gen.



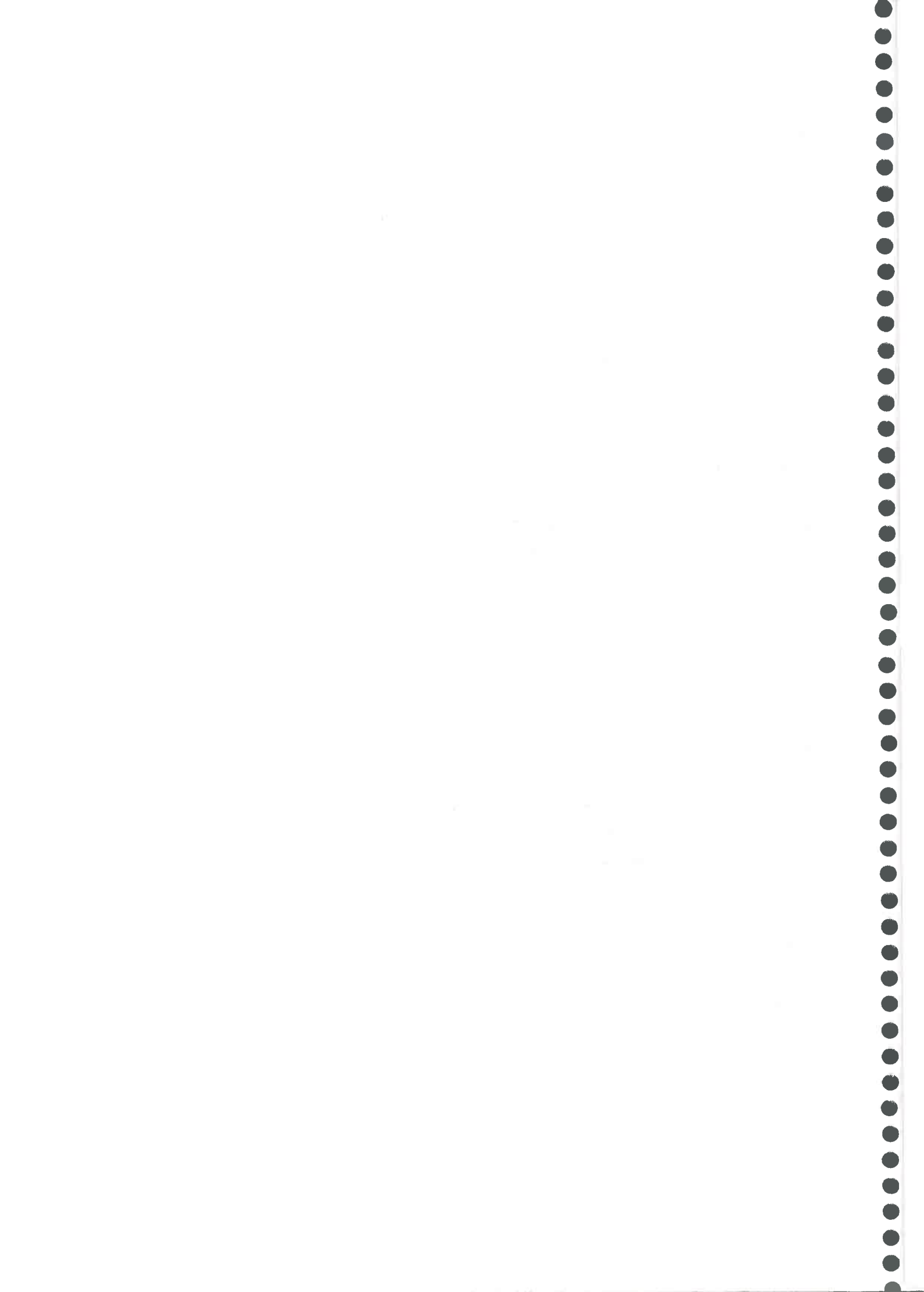




Referencias



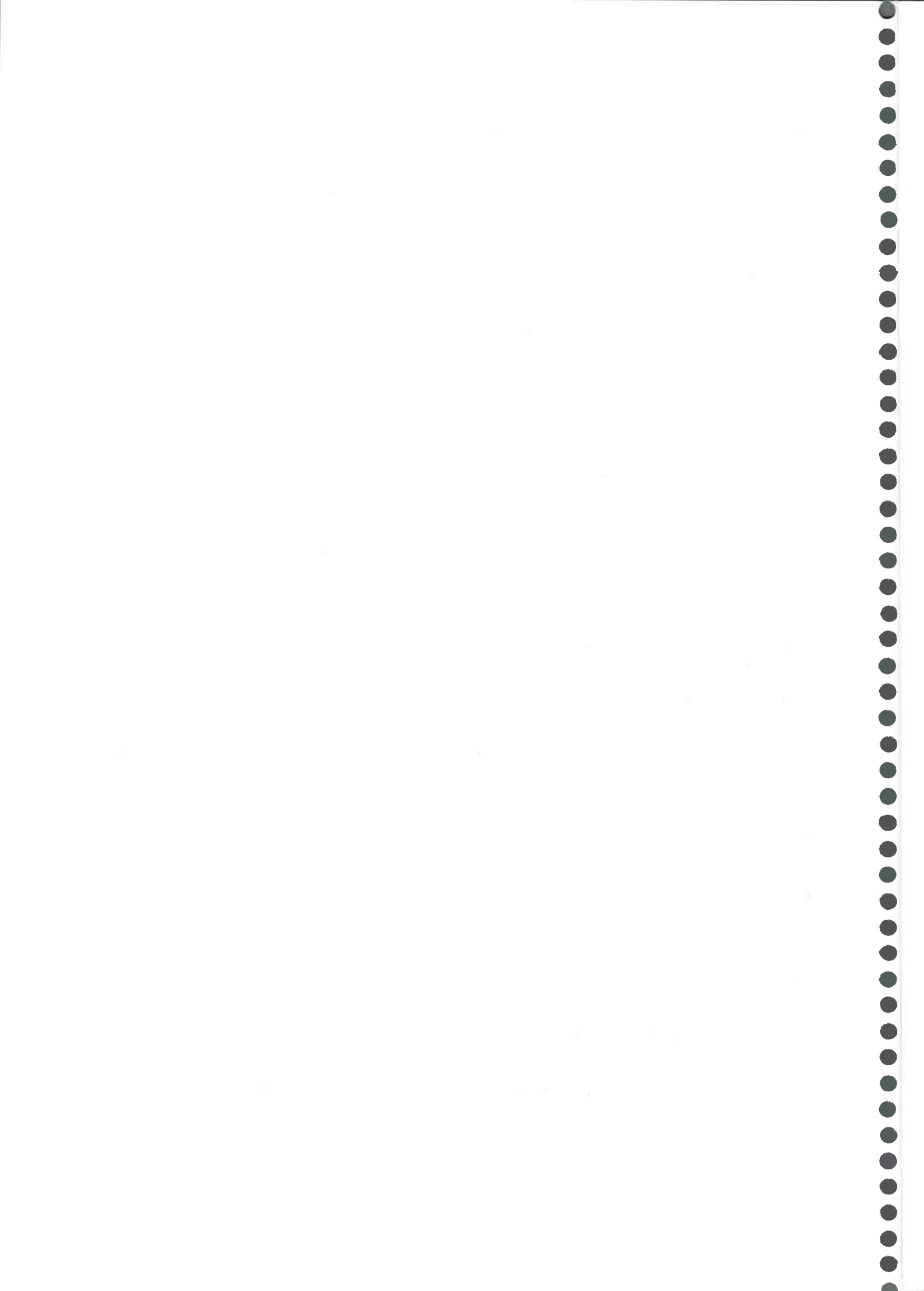
- Aarestrup, F., Wegener C. y Rosdahl V.T.** 1995. Evaluation of phenotypic and genotypic methods for epidemiological typing of *Staphylococcus aureus* isolates from bovine mastitis in Denmark. *Vet. Microbiol.* **45**:139-150.
- Aarestrup FM, Larsen HD, Eriksen NH, Elsberg CS, Jensen NE.** 1999. Frequency of alpha- and beta-haemolysin in *Staphylococcus aureus* of bovine and human origin. A comparison between pheno- and genotype and variation in phenotypic expression. *APMIS.* **107**:425-30.
- Acuña C.N., Chertcoff R. E., Cisneros G., Izak E. y Nimo J.M.** 2000. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from quarters with clinical mastitis in Argentina. *Proceedings National Mastitis Council Annual Meeting.* Atlanta, GE. p. 217-218.
- Akineden, Ö., Annemüller, C., Hassan, A. A., Lämmler, Ch., Wolter, W. y Zschöck, M.** 2001. Toxin genes and other characteristics of *Staphylococcus aureus* isolates from milk of cows with mastitis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**: 959-964.
- Almeida R., Matthews E., Cifrian A., Guidry A. y Oliver S.** 1996. *Staphylococcus aureus* invasion of bovine mammary epithelial cells. *J. Dairy Sci.* **79**:1021-1026.
- Annemüller, C., Lämmler, C. y Zschöck, M.** 1999. Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* **69**: 217-224
- Bair-Parker, A.C.** 1974. Micrococcaceae. In: *Bergey's manual of determinative bacteriology* (Eds. R.E. Buchanan, N. E. Gibbons). Baltimore, Williams and Wilkins. Pag 478-490.
- Bannerman T., Hancock G., Tenover F. y Miller M.** 1995. Pulsed- field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 551 - 555.
- Bauer, A., Kirby W., Sherris J. y Turck M.** 1966. Antibiotic susceptibility. Testing by a standardized single disc method. *Am. J. Clin. Pathol.* **45**: 493-496.
- Baumgartner, A., Nicolet, J. y Eggimann M.** 1984. Plasmid profiles of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis. *J. Appl. Bacteriol.* **56**:159-163.
- Bayles K., Wesson C., Liou L., Fox L., Bohach G. y Trumble W.** 1998. Intracellular *Staphylococcus aureus* escapes the endosome and induces apoptosis in Epithelial cells. *Inf. Inm.* **66**: 336-342.
- Benito, Y., Lina, G., Greenland, T., Etienne, J. y Vandenesch, F.** 1998. trans-complementation of a *Staphylococcus aureus agr* mutant by *Staphylococcus lugdunensis agr* RNAIII. *J Bacteriol* **180**: 5780-5783.
- Bernheimer, A.** 1988. Assay of hemolytic toxins. *Methods in Enzymol.* Editores: Charles W. Carter, Jr. & Robert M. Sweet. Academic Press. San Diego, California. p. 165:213-217.
- Bertolatti D, O'Brien F. y Grubb W.** 2003. Characterization of drug-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from poultry processing plants in Western Australia. *Int J Environ Health Res.* **13**: 43-54.
- Bogni C., Calzolari A., Nagel R., Segura M., Giraud A. y Giraud J.** 1998. Avirulent and immunogenicity in mice of a bovine mastitis *S. aureus*. *Can. J. Vet. Res* **62**: 293-298.
- Booth M.C., Pence L.M., Mahasreshti P., Callegan M.C., y Gilmore M.S.** 2001. Clonal associations among *Staphylococcus aureus* isolates from various sites of infection. *Infect Immun.* **69**:345-52



- Buddle, B. M. y Cooper, M. G.** 1978. Aspects of the epidemiology of bovine staphylococcal mastitis. *New Zealand Vet. J.* **26**: 296-298.
- Buzzola F.R., Quelle L., Gomez M.I., Catalano M., Steele-Moore L., Berg D., Gentilini E., Denamiel G. y Sordelli D.O.** 2001. Genotypic analysis of *Staphylococcus aureus* from milk of dairy cows with mastitis in Argentina. *Epidemiol Infect.* **126**:445-452.
- Caetano-Annoles G. y Gresshoff P.** 1998. DNA Markers protocols, applications and overviews. Ed. Wileys-Liss
New York. USA. p.151-171.
- Calvinho L.F., Toselli F.G., Weimann W.R., Canavesio V.R., Neder V.E., Iguzquiza I.A.** 2002. Antimicrobial sensitivity of coagulase-positive staphylococcal strains isolated from bovine mastitis in the central dairy catchment area of Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* **34**:171-5.
- Calzolari A., Giraudo J., Rampone A., Odierno L., Rampone H., Giraudo A., Frigerio C., Bettera S., Ferrari M., Mattea M., Webe M., Hernández J., Nagel R. y Raspanti C.** 1997. Field trials in Argentina of a vaccine against bovine mastitis. 2. Evaluation in two dairy herds. *J. Dairy Sci.* **80**: 854-858.
- Carrol, P. y Francis P.** 1985. The basic phage set for typing bovine staphylococci. *J. Hyg. Camb.* **95**:665-669.
- CDC — Division of Health care Quality Promotion — Issues in Health care Settings.** 1999. Laboratory detection of oxacilin, methicillin resistant *S. aureus* (MRSA).
www.cdc.gov/ncidod/hip/Lab/FactSheet/mrsa.htm
- Capita R., Alonso-Calleja C., Garcia-Fernandez M.C. y Moreno B.** 2002. Characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from poultry meat in Spain. *Poult Sci.* **81**:414-21.
- Chakraborty, R. y Rao, C. R.** 1991. Measurements of genetic variation for evolutionary studies.. In C.R. Rao and R. Chakraborty R (ed.). Handbook of statistics, Vol 8. Elsevier, Amsterdam. p. 271-316
- Chambers H.** 2001. The changing epidemiology of *S. aureus*. Special Issue. Emerging infectious diseases. **7**: 178-182.
- Crisci J. y López Armengol M.** 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. (Serie Biología). Monografía nº 26. Sec. Gral. De la OEA Prog. Desarrollo Científico y Técnico. Washington DC.
- De Buysier M., Dilasser F., Hummel R. y Bergdoll M.** 1987. Enterotoxin and toxin shock syndrome toxin-1 production by staphylococci isolated from goats milk. *Int. J. Food Microbiol.* **5**: 301-309.
- Del- Vecchio V., Petroziello J., Gress M., McCleskey F., Melcher G., Crouch H. y Lupski J.** 1995. Molecular genotyping of MRSA via fluorophore-enhance repetitive-sequence PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33**: 2141-2144.
- De Oliveira A.P., Watts J.L., Salmon S.A. y Aarestrup F.M.** 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Europe and the United States. *J. Dairy Sci.* **83**: 855-62.

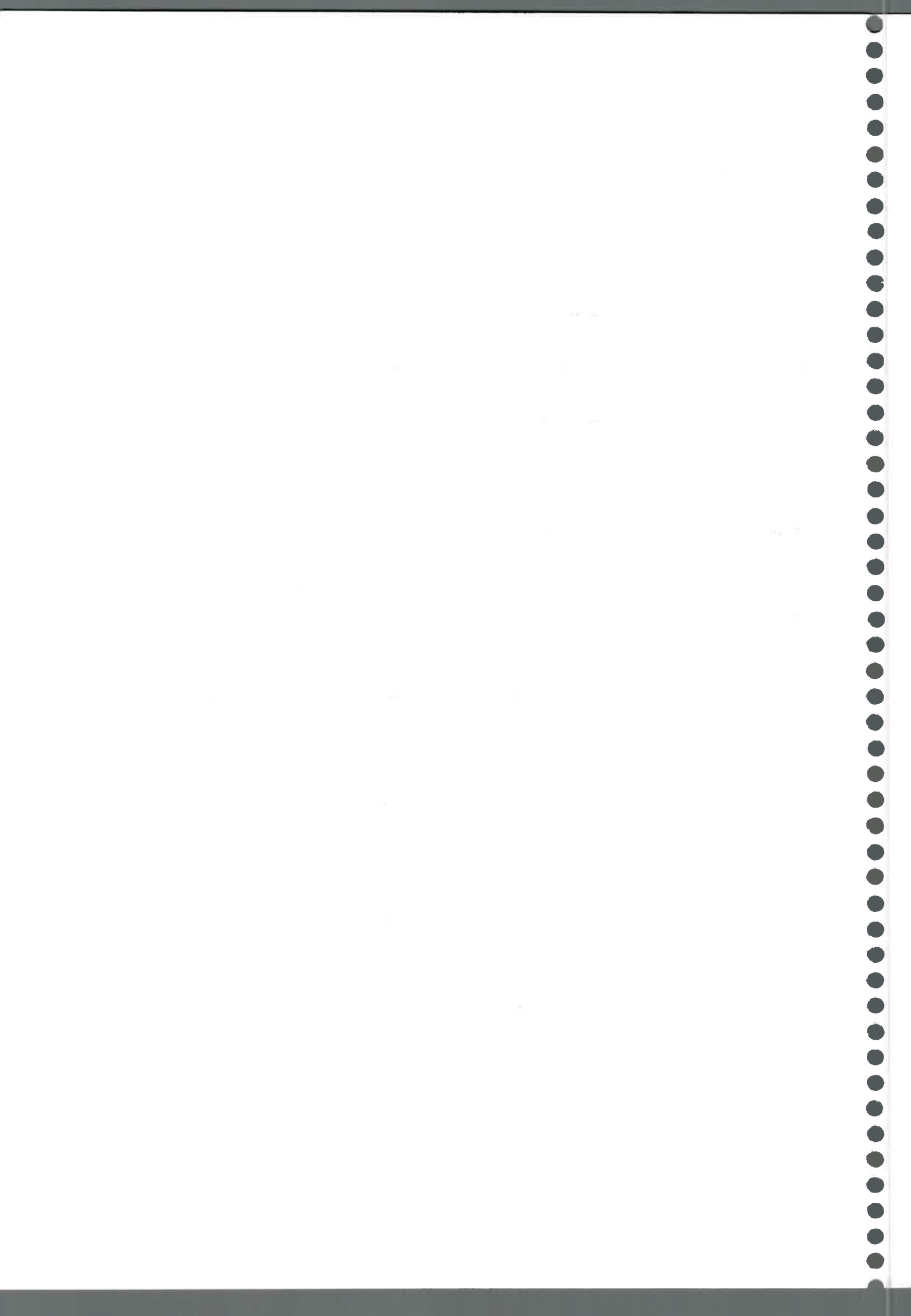
- Devriese L.A.** 1984. A simplified system for biotyping *Staphylococcus aureus* strains isolated from different animal species. *J. Appl Bacteriol.* **56**: 215-220.
- Dice, L.R.** 1945. Measurements of the amount of ecologic association between species. *Ecology.* **26**: 297-302.
- Dieffenbach C. W. y Dveksler G. S.** 1995. PCR Protocols. Academic Press, San Diego, California. P. 3-18.
- el-Ghodban A., Ghenghesh K.S., Marialigeti K. y Tawil A.** 1999. Enterotoxins and phage typing of *S. aureus* isolated from clinical material and food in Libya. *Arch Inst Pasteur Tunis.* **76**:23-5
- Fattom A., Sawar J., Ortiz A. y Naso R.** 1996. A *Staphylococcus aureus* capsular polysaccharide (CP) vaccine and CP-specific antibodies protect mice against bacterial challenge. *Infect. Immun.* **64**:1659-1665.
- Fitzgerald R., Meaney W, Hartigan P., Smyth C. y Kapur V.** 1997. Fine structure molecular epidemiological analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *Epidemiol. Infect.* **119**: 261-269.
- Fitzgerald R., Monday S., Foster T., Bohach G., Hartigan P., Meaney W. y Smyth C.** 2001. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine *Staphylococcus aureus* encoding multiple superantigens. *J.Bact.* **183**: 63-70.
- Frenay H., Bunschoten A., Schouls L., van Leeuwen W., Vandenbroucke-Grauls C., Verhoef J. y Mooi F.** 1996. Molecular typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* on the basis of protein A gene polymorphism. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **15**:60-4.
- Fox, L., Gershman, M., Hanock, D. y Hutton, C.** 1991. Fomites and reservoirs of *Staphylococcus aureus* causing intrammary infections as determined by phage typing: the effect of milking hygiene practices. *Cornell Vet.* **81**:183-193.
- Genigeorgis C. A.** 1989. Present state of knowledge on staphylococcal intoxication. *Int. J. Food Microbiol.* **9**:327-360.
- Gentilini E., Denamiel G., Llorente P., Godaly S., Rebuelto M. y DeGregorio O.** 2000. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis in Argentina. *J Dairy Sci.* **83**: 1224-1227.
- Gentilini E., Denamiel G., Betancor A., Rebuelto M., Rodríguez Fermepin M. y De Torresi A.** 2002. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis in Argentina. *J. Dairy Sci.* **85**:1913-1917.
- Gilot P. y van Leeuwen W.** 2004. Comparative analysis of *agr* locus diversification and overall genetic variability among bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *J Clin Microbiol.* **42**:1265-9.
- Gillaspy, A., Lee, C., Sau, S., Cheung A. y Smeltzer M .** 1998. Factors affecting the collagen binding capacity of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **66**: 3170-3178.

- Giraudó A., Rampone H., Calzolari A. y Nagel R. 1996. Phenotypic characterization and virulence studies of *agr-sae* double mutants of *Staphylococcus aureus*. *Can. J. Microbiol.* **32**: 120-123.
- Giraudó J., Calzolari A., Rampone A., Rampone H., Giraudó A., Bogni C., Larriestra A. y Nagel R. 1997. Field trials in Argentina of a vaccine against bovine mastitis. 1. Evaluation in heifers. *J. Dairy Sci.* **80**:845-853.
- Giraudó A., Cheung A. y Nagel R. 1997. The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* controls exoprotein synthesis at the transcriptional level. *Arch. Microbiol.* **168**: 53-58.
- Giraudó A., Calzolari A., Cataldi A.A., Bogni C. y Nagel R. 1999. The *sae* locus of *Staphylococcus aureus* encodes a two-component regulatory system. *FEMS Microbiol Lett.* **177**:15-22. Erratum in: *FEMS Microbiol Lett* **180**:117.
- Giraudó A., Mansilla C., Chan A., Raspanti C. y Nagel R. 2003. Studies on the expression of regulatory locus *sae* in *Staphylococcus aureus*. *Curr. Microbiol.* **46**:246-50.
- Goh S.H., Byrne S.K., Zhang J.L. y Chow A.W. 1992. Molecular typing of *Staphylococcus aureus* on the basis of coagulase gene polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* **30**:1642-5.
- Guss B., Uhlen M., Nilsson B., Lindberg M., Sjoquist J. y Sjobahl J. 1984. Region X, the cell-wall-attachment part of staphylococcal protein A. *Eur J Biochem.* **138**:413-20.
- Grinsted J. y Lacey R. 1973. Ecological and Genetic implications of pigmentation in *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **75**: 259-267.
- Hacker J. y Kaper J. 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **54**: 641-679.
- Hájek V. & Marsálek, E. 1971. The differentiation of pathogenic staphylococci and a suggestion for their taxonomic classification. *Zentralbl. Bakteriol. Abt. I. Orig. A.* **217**: 176-182.
- Hennekinne J. A., Kerouanton A., Brisabois A. y De Buyser M.L. 2003. Discrimination of *Staphylococcus aureus* biotypes by pulsed-field gel electrophoresis of DNA macro-restriction fragments. *J Appl Microbiol.* **94**:321-9.
- Herr G. Erni L, González A., Bargagna M. y Cerutti R. 1990. Eficacia del cefacetril en el tratamiento de mastitis clínica bovina. *Rev. Med. Vet. (Bs. As.)* **71**:34-39.
- Herron L.L., Chakravarty R., Dwan C., Fitzgerald J.R., Musser J.M., Retzel E. y Kapur V. 2002. Genome sequence survey identifies unique sequences and key virulence genes with unusual rates of amino acid substitution in bovine *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun.* **70**:3978-3981.
- Hienz S., Schennings T., Heimdahl A. y Flock J. 1996. Collagen binding of *Staphylococcus aureus* is a virulence factor in experimental endocarditis. *J. Infect. Dis.* **174**:83-88.
- Hiramatsu K., Cui, L., Kuroda M e Ito T. 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Trends Microbiol.* **9**:4896-4893.
- Hoefnagel-Schuermans A., Peetermans W., Struelens M., van Lierde S. y Van Eldere J. 1997. Clonal analysis and identification of epidemic strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by



- antibiotyping and determination of protein A gene and coagulase gene polymorphisms. *J. Clin. Microbiol.* **35**: 2514-2520.
- Hunter P. y Gaston M. 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* **26**: 2465-2466.
- Ito T., Katayama Y., Asda K., Mori N., Tsutsumimoto K., Tiensasitorn C. y Hiramatsu K. 2001. Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *S. aureus*. *Ant. Agents Chemoth.* **45**: 1323-1336.
- Jarraud S., Lyon G., Figueiredo A., Gérard L., Denesch F., Etienne J., Muir T. y Novick R. 2000. Exfoliatin-producing strains define a fourth *agr* specificity group in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **22**: 6517-6522.
- Jersek, B., Gilot, P., Gubina, M., Klun, N., Mehle, J., Tcherneva, E., Rijpens, N. y Herman, L. 1999. Typing of *Listeria monocytogenes* strains by repetitive element sequence based PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **37**: 103-109.
- Kapur V., Sischo W., Greer R., Whittamh T. y Musser J. 1995. Molecular population genetic analysis of *Staphylococcus aureus* recovered from cows. *J. Clin. Microbiol.* **33**:376-80.
- Karakawa W. y Vann W. 1992. Capsular polysaccharides of *Staphylococcus aureus*. *Semin. Infect. Dis.* **4**:285-293.
- Kluytmans J., van Belkum A. y Verbrugh H. 1997. Nasal carriage of *Staphylococcus aureus*: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**:505-20.
- Kreiswirth B., Löhfdahl M., Betley M., O'Reilly M., Schlievert P., Bergdoll M. y Novick R. 1983. The toxic shock syndrome exotoxin structural gene is not detectably transmitted by a prophage. *Nature.* **305**:709-712.
- Kreiswirth B., Kornblum J., Arbeit R., Eisner W., Maslow J., McGeer A., Low D. y Novick R. 1993. Evidence for a clonal origin of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Sci.* **259**:227-230.
- Krumperman P. 1983. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **46**:165-70.
- Krut O., Utermohlen O., Schlossherr X. y Kronke M. 2003. Strain-specific association of cytotoxic activity and virulence of clinical *Staphylococcus aureus* isolates. *Infect Immun.* **71**:2716-23.
- Lowy F.D. 2003. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* **111**:1265-73.
- Luong T., Newell S. y Lee C. 2003. *Mgr*, a novel global regulator in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **185**:3703-10.
- McDonald J. y Anderson A. 1981. Antibiotic sensitivity of *Staphylococcus aureus* and coagulase negative staphylococci isolated from infected bovine mammary glands. *Cornell Vet.* **71**:391-396.
- Madison, R. 1935. Fibrinolytic staphylococci. *Proceedings of the Society for experimental Biology and Medicine*, **33**:210-211.
- Magee C., Sagi R., Scott N.R. y Gates R.S. 1984. Bacterial transport within and among various teatcup

- and cluster assemblies during milking. *J. Dairy Sci.* **67**: 2034-40.
- Martínez J.L. y Baquero F.** 2002. Interactions among strategies associated with bacterial infection: pathogenicity, epidemicity, and antibiotic resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**:647-79.
- Martínez G., Harel J., Higgins R., Lacouture S., Daignault D. y Gottschalk M.** 2000. Characterization of *Streptococcus agalactiae* isolates of bovine and human origin by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J. Clin. Microbiol.* **38**:71-8.
- Matthews K., Harmon R. y Langlois B.** 1992. Prevalence of *Staphylococcus* species during the periparturient period in primiparous and multiparous cows. *J. Dairy Sci.* **75**:1835-1838.
- Matthews K, Kumar S., O Conner S., Harmon R., Pankey J., Fox L. y Oliver S.** 1994. Genomic fingerprints of *Staphylococcus aureus* of bovine origin by polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Epidemiol. Infect.* **112**: 177-186.
- Moore P. y Lindsay J.** 2001. Genetic Variation among hospital isolates of methicillin sensitive *Staphylococcus aureus*: evidence for horizontal transfer of virulence genes. *J. Clin. Microbiol.* **39**:2760-2767.
- Musser J. y Kapur V.** 1992. Clonal analysis of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains from intercontinental sources: association of the *mec* gene with divergent phylogenetic lineages implies dissemination by horizontal transfer and recombination. *J. Clin. Microbiol.* **30**:2058-2063.
- Myllys V., Ridell J., Björkroth J., Biese I. y Pyörälä, S.** 1997. Persistence in bovine mastitis of *Staphylococcus aureus* clones as assessed by random amplified polymorphic DNA analysis, ribotyping and biotyping. *Vet. Microbiol.* **51**: 245-251.
- Nashev D., Toshkova K., Salasia S. I. O., Hassan A. A., Lämmle C. y Zschöck M..** 2004. Distribution of virulence genes of *Staphylococcus aureus* isolated from stable nasal carriers. *FEMS Microbiol. Lett.* **233**: 45-52.
- Nemeth J. y Lee J.** 1995. Antibodies to capsular polysaccharides are protective against experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Infect. Immun.* **63**:375-380.
- Novick R., Ross H., Projan S., Kornblum J, Kreiswirth B. y Moghazed S.** 1993. Synthesis of staphylococcal virulence factors is controlled by a regulatory RNA molecule. *EMBO J.* **12**: 3967-3975.
- Novick R.P. y Jiang D.** 2003. The staphylococcal *saeRS* system coordinates environmental signals with *agr* quorum sensing. *Microbiol.* **149**:2709-2717.
- Ombui J.N., Kimotho A.M. y Nduhiu J.G.** 2000. Antimicrobial resistance patterns and plasmid profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and meat. *East. Afr. Med. J.* **77**:463-7.
- Olive M. y Bean P.** 1999. Principles and applications of methods for DNA-based typing microbial organisms. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1661-1669.
- Oppenheim A.B., Rudd K.E., Mendelson I. y Teff D.** 1993. Integration host factor binds to a unique class of complex repetitive extragenic DNA sequences in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **10**:113-22.



- Peacock, S., Moore, C., Justice, A., Kantazanou, M., Story, L., Mackie, K., O'Neil, G. y Day, N. 2002. Virulent combinations of adhesin and toxin genes in natural populations of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* **70**: 4987-4996
- Piccini R. y Zecconi A. 2001. Relationship among plasmids recovered from *Staphylococcus aureus*, milk leukocytes, and antimicrobial resistance. *J. Dairy Sci.* **84**:2641-8.
- Pielou E. 1984. The interpretation of the ecological data: A Primer on Classification and Ordination. Wiley. New York.
- Protocolos Promega. <http://medgen.iupui.edu/ohenega/p14.html>.
- Reinoso E, Magnano G, Giraudo J, Calzolari A, Bogni C. 2002. Bovine and rabbit models for the study of a *Staphylococcus aureus* avirulent mutant strain, RC122. *Can. J. Vet. Res.* **66**:285-8.
- Reinoso E, Bettera S., Frigerio C., Di Renzo M., Calzolari A. y Bogni C. 2004. RAPD-PCR analysis of *Staphylococcus aureus* strains isolated from bovine and human hosts in Argentina. *Microbiol. Res. In press.*
- Rivas, A. L., Gonzalez, R. N., Wiedmann, M., Bruce, J.L., Cole, E.M., Bennett, G. J., Schulte, H.F. Wilson, D. J., Mohammed, H. O., y Batt C. A.. 1997. Diversity of *Streptococcus agalactiae* and *Staphylococcus aureus* ribotypes recovered from New York dairy herds. *Am. J. Vet. Res.* **58**: 482-487.
- Rohlf J. 1993. Manual NTSYS. Numerical taxonomy and Multivariate Analyses System. New York.
- Rosec J., Guiraud J., Dalet C. y Richard N. 1997. Enterotoxin production by staphylococci isolated from foods in France. *Int. J. Food Microbiol.* **35**: 213-232.
- Sabat A., Krzyszton-Russjan J., Strzalka W., Filipek R., Kosowska K., Hryniewicz W., Travis J. y Potempa J. 2003. New method for typing *Staphylococcus aureus* strains: multiple-locus variable number tandem repeat analysis of polymorphism and genetic relationships of clinical isolates. *J. Clin Microbiol.* **41**: 1801-1804.
- Sambrook J., Fritsch E. y Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. Second Edition. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.
- Saulnier P., Bourneix C., Prévost G. y Andremont. 1993. Random Amplified Polymorphic DNA Assay is less discriminatory than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **31**: 982-985.
- Seguin J., Walker R., Caron J., Kloss W., George C., Hollis R., Jones R. y Pfaller M. 1999. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak in a veterinary teaching hospital: potential human-to-animal transmission. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1459-1463.
- Selander R. y Musser J. 1990. Population genetics of bacterial pathogenesis, p-11-36. In. B. H. Iglewski and V. Clark. (ed.). Molecular basis of bacterial pathogenesis. Academic Press, Inc., San Diego.
- Shopsin B., Gomez M., Montgomery S., Smith D., Waddington M., Dodge D., Bost D., Riehman M, Naidich S. y Kreiswirth B. 1999. Evaluation of protein A gene polymorphic region DNA sequencing for typing of *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* **37**:3556-3563.

- Shopsin B., Gomez M., Waddington M., Riehman M. y Kreiswirth B.N.** 2000. Use of coagulase gene (coa) repeat region nucleotide sequences for typing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *J. Clin. Microbiol.* **38**:3453-6.
- Sneath P. y Sokal R.** 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman. San Francisco.
- Smeltzer M.S., Gillaspay A.F., Pratt F.L., Thames M.D. e Iandolo J.J.** 1997. Prevalence and chromosomal map location of *Staphylococcus aureus* adhesin genes. *Gene.* **196**:249-59.
- Sompolinsky, D., Samra Z., Karakawa W., Vann W., Schneerson R. y Malik Z.** 1985. Encapsulation and capsular types in isolates of *S. aureus* from different sources and relationship to phage types. *J. Clin. Microbiol.* **22**:828-834.
- Sordelli D.O., Buzzola F.R., Gomez M.I., Steele-Moore L., Berg D., Gentilini E., Catalano M., Reitz A.J., Tollersrud T., Denamiel G., Jeric P. y Lee J.C.** 2000. Capsule expression by bovine isolates of *Staphylococcus aureus* from Argentina: genetic and epidemiologic analyses. *J. Clin. Microbiol.* **38**:846-50
- Steinhueber A., Goerke C., Bayer M., Doring G. y Wolz C.** 2003. Molecular architecture of the regulatory locus *sae* of *Staphylococcus aureus* and its impact on expression of virulence factors. *J. Bacteriol.* **185**: 6278-6286.
- Stephan R., Annemüller C., Hassan A. y Lämmli Ch.** 2001. Characterization of enterotoxigenic *S. aureus* strains isolated from bovine mastitis in north-east Switzerland. *Vet. Microbiol.* **78**: 373-382.
- Stern M., Ames G., Smith N., Robinson E. y Higgins C.** 1984. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. *Cell.* **37**: 1015-1026.
- Strommenger B., Cuny C., Werner G. y Witte W.** 2003. Obvious lack of association between dynamics of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in central Europe and *agr* specificity groups. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* **23**:15-19.
- Takahashi S. y Nagano Y.** 1984. Rapid procedure for isolation of plasmid DNA and application to epidemiological analysis. *J. Clin. Microbiol.* **20**:608-13
- Tenover F., Arbeit R., Archer G., Biddle J., Byrne S., Goering R., Hancock G., Hébert A., Hill B., Hollis R., Jarvis W., Kreiswirth B., Eisner W., Maslow J., McDougal L., Miller M., Mulligan M., y Pfaller M.** 1994. Comparison of traditional and molecular methods of typing isolated of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* **32**:407-415.
- Toshkova K., Annemüller C., Akineden O. y Lämmli C.** 2001. The significance of nasal carriage of *Staphylococcus aureus* as risk factor for human skin infections. *FEMS Microbiol. Lett.* **202**:17-24.
- Tranter H. S. y Brehm R. D.** 1994. The detection and etiological significance of staphylococcal enterotoxins. *Reviews in Medical Microbiol.* **5**:56-64.
- Uhlen M., Guss B., Nilsson B., Gatenbeck S., Philipson L. y Lindberg M.** 1984. Complete sequence of the staphylococcal gene encoding protein A. *J. Biol. Chem.* **259**:1695-1702.



- van Belkum A. y Verbrugh H. 1997. Molecular epidemiology: what the epidemiologist needs to know. *Current Opinion Inf. Dis.* **10**:296-303.
- van Belkum A., Scherer S., van Alphen L. y Verbrugh H. 1998. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:275-93.
- van der Zee A., Verbakel H., van Zon J.C., Frenay I., van Belkum A., Peeters M., Buiting A. y Bergmans A. 1999. Molecular genotyping of *Staphylococcus aureus* strains: comparison of repetitive element sequence-based PCR with various typing methods and isolation of a novel epidemicity marker. *J. Clin. Microbiol.* **37**:342-349.
- Versalovic J., Koeth T. y Lupski J. 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* **25**:6823-31.
- Vintov J., Aarestrup F.M., Zinn C.E. y Olsen J.E. 2003. Association between phage types and antimicrobial resistance among bovine *Staphylococcus aureus* from 10 countries. *Vet. Microbiol.* **29**:133-47.
- Watts, J. 1988. Etiological agents of bovine mastitis. *Vet. Microbiol.* **16**: 41-46.
- Welsh J. y McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* **18**: 7213-7218.
- Wielders C., Fluit A., Brisse S., Verhoef J. y Schmitz F. 2002. *mecA* gene is widely disseminated in *Staphylococcus aureus* population. *J. Clin. Microbiol.* **40**: 3970-3975.
- Williams J., Kubelik A., Livak K., Rafalski A. y Tingey S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* **18**:6531-6135.
- Willis A., Smith J. y O'Connor J. 1966. Properties of some epidemic strains of *Staphylococcus aureus*. *J.Pathol.Bacteriol.* **92**: 345-358.
- Zadoks R., van Leeuwen W., Barkema H., Sampimon O., Verbrugh H., Schukken Y.H. y van Belkum A. 2000. Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **38**:1931-9.



01 10

U.N.R.C.
Biblioteca Central



60186

60186

